

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Modificación por Ácido L-Úsnico de estructuras que
soportan la permeabilidad celular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Blanca Cifuentes Cuencas

DIRECTOR:

Carlos Vicente Córdoba

Madrid, 2015

Blanca Cifuentes Cuencas

TP
1981
129



x - 53 - 013381 - 9

MODIFICACION POR ACIDO L-USNICO DE ESTRUCTURAS QUE SOPORTAN
LA PERMEABILIDAD CELULAR

Departamento de Botánica y Fisiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Blanca Cifuentes Cuencas
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-15934-1981

BLANCA CIFUENTES CUENCAS

MODIFICACION POR ACIDO L-USNICO DE ESTRUCTURAS QUE SOPORTAN
LA PERMEABILIDAD CELULAR

Director: Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba
Catedrático de Fisiología Vegetal
de la Facultad de Biología de la
Universidad Complutense

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Biología
Cátedra de Fisiología Vegetal
1980

A mis padres, José Luis y Fuencisla
con mi mayor agradecimiento

El presente trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense, gracias a una Beca del I.N.A.P.E. (Ministerio de Universidades), y bajo la dirección del Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba, sin cuya constante orientación, estímulo y eficaz ayuda no hubiera podido ser realizado. Asimismo deseo expresar mi agradecimiento al Prof. D. Miguel Rubio, del Instituto Jaime Ferrán (CSIC), al Prof. D. Emilio Muñoz y a D. Antonio Guerrero, de la Unidad de Biomembranas del Instituto de Inmunología y Biología Microbiana (CSIC) y a todos mis compañeros de laboratorio.

ABREVIATURAS

DEAE-Celulosa dietil aminoetil celulosa

DTT ditiotreitol

EDTA ácido etilendiamino tetracético

SDS dodecil sulfato sódico

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TRIS Tris-(hidroximetil) aminometano

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Papel biológico de las sustancias liquénicas..	1
1.1.1. ácidos úsnicos	1
1.1.2. Capacidad quelante	1
1.1.3. Protección de pigmentos fotosintéticos	3
1.1.4. Actividad antibiótica	4
1.1.5. Acción sobre la permeabilidad celular	6
1.2. Cubiertas celulares	7
1.2.1. Membrana plasmática	7
1.2.2. Pared celular	8
1.2.2.1. Péptidoglicano	8
1.2.2.2. Membrana externa	9
1.2.2.3. Funciones de la pared celular	11
1.3. Glucosamina-6-P sintetasa	12
2. MATERIALES Y METODOS	18
2.1. Microorganismo utilizado	18
2.2. Medios y condiciones de cultivo	18
2.3. Estimación del crecimiento	18
2.4. Obtención de extractos libres de células	19
2.5. Medida de la cantidad de proteínas	20
2.6. Medida de actividades enzimáticas.....	20
2.6.1. Actividad glucosamina-6-P sintetasa	20
2.6.1.1. Ensayo enzimático	20
2.6.1.2. Acetilación de la glucosamina formada .	20
2.6.1.3. Valoración de la glucosamina acetilada	21
2.6.2. Actividad málico deshidrogenasa	21
2.6.3. Actividad isocítrico deshidrogenasa	21
2.6.4. Actividad succínico deshidrogenasa	22
2.7. Preparación de vesículas y medida de la fosforilación oxidativa	22
2.8. Valoración de la desaparición de glucosa de los medios de cultivo	23

2.9. Valoración de la desaparición de amonio de los medios de cultivo	24
2.10. Oxidación de fumarato por células enteras	24
2.11. Resistencia al choque osmótico	24
2.12. Purificación del enzima glucosamina-6-P sintetasa	25
2.12.1. Preparación del extracto libre de células ...	25
2.12.2. Eliminación de los ácidos nucleicos	25
2.12.3. Adsorción sobre gel de fosfato cálcico	
2.12.4. Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa	26
2.13. Estimación del ácido úsnico ligado al enzima	26
2.14. Electroforesis en gel de poliacrilamida	27
2.14.1. Sistema de gel en placa en gradiente lineal de poliacrilamida	27
2.14.2. Sistema de gel en placa en gradiente lineal de poliacrilamida con SDS.....	28
2.15. Determinación del peso molecular de la glucosamina- -6-P sintetasa	28
2.16. Preparación de células para microscopía electró- nica	28
 3. RESULTADOS	 30
3.1. Efecto del L-usnato sobre el crecimiento de <u>Proteus mirabilis</u> y sobre la capacidad de oxidación del fumarato	30
3.2. Efecto del L-usnato sobre los niveles de actividad de deshidrogenasas del ciclo de KREBS	37
3.3. Modificación de la resistencia osmótica en células cultivadas sobre L-usnato	40
3.4. Observación de las células al microscopio elec- trónico	43
3.5. Efecto del ácido L-úsnico sobre el crecimiento de <u>Proteus mirabilis</u> y sobre la actividad glucosamina-6-P sintetasa	43
3.6. Estimación del consumo de glucosa y sulfato amónico	47

3.7. Efecto de la actinomicina D sobre el crecimiento y la actividad glucosamina-6-P sintetasa	50
3.8. Efecto del cloranfenicol sobre el crecimiento de <u>Proteus mirabilis</u> y la actividad glucosamina- -6-P sintetasa	58
3.9. Purificación y propiedades de la glucosamina-6-P sintetasa	63
3.9.1. Temperatura y pH óptimos	65
3.9.2. Cinética enzimática y efecto del ácido L-úsnico	65
3.9.3. Determinación del peso molecular	71
3.9.4. Espectros característicos	75
3.9.5. Cinéticas de unión enzima-ligando	78
3.9.6. Naturaleza de la unión	84
4. DISCUSION	87
5. CONCLUSIONES	94
6. BIBLIOGRAFIA	97

1. INTRODUCCION

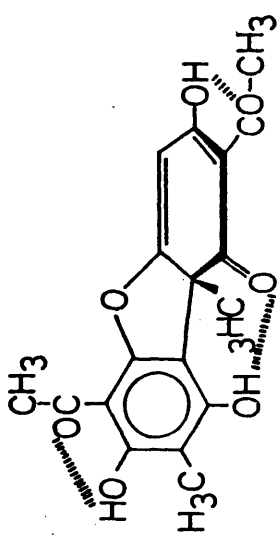
1.1. Papel biológico de las sustancias liquénicas.

1.1.1. Ácidos úsnicos.- Dentro del conjunto de productos del metabolismo secundario en líquenes han merecido especial atención los ácidos úsnicos. Fueron aislados por primera vez en 1843 (ROCHLEDER y HELDT) a partir de Ramalina calicaris y Usnea barbata, y sintetizados más tarde por BARTON et al. (1956)

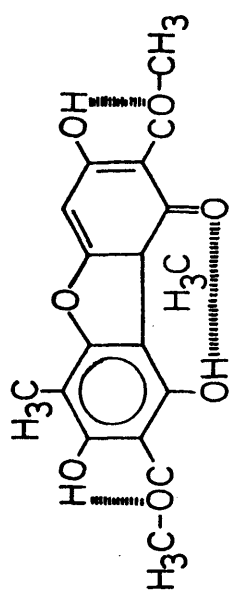
STOLL et al. (1947) y SAVICH et al. (1960) apreciaron dos formas ópticas diferentes, una dextrógira y otra levógira. Posteriormente, SHIBATA y TAGUCHI (1967) descubrieron dos nuevas formas isoméricas, el ácido D-isoúsnico, aislado de Cladonia mitis y Cladonia arbuscula, y el ácido L-isoúsnico, aislado de Cladonia pleurota (ver figura 1).

Los ácidos úsnicos están constituidos por dos unidades fenólicas derivadas de una ciclación floroglucínica y metiladas en posición 4 como metilfloroacetofenona. Ambos ciclos se unen mediante un enlace entre el carbono 6 de la primera unidad y el carbono 4 de la segunda, lo que posibilita la existencia de formas ópticas diferentes, dextro y levo, al conservar ambas unidades fenólicas libertad de giro alrededor del enlace carbono-carbono antes de ser formado el heterociclo furánico (CULBERSON, 1969).

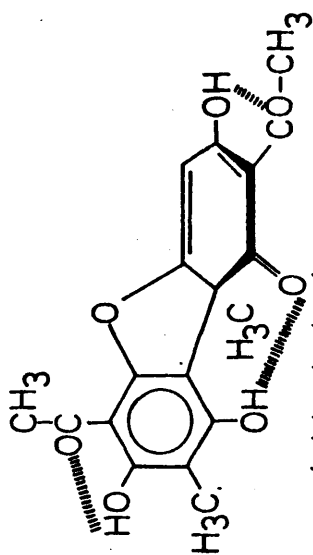
1.1.2. Capacidad quelante.- Como productos del metabolismo liquénico acumulables en el cortex, las funciones que pudieran desempeñar las sustancias liquénicas han estado sometidas a grandes controversias y solo poco a poco se han ido dilucidando algunas de ellas. Por su significado pedogenésico, la que más atención ha recibido es aquella que deriva de su acción quelante. Es bastante conocida la facilidad con que los líquenes almacenan en su talo cationes inorgánicos, como Zn^{2+} (LAMBINON et al., 1964), Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} (AHMADJIAN, 1967), Mn^{2+} , Fe^{2+} ,



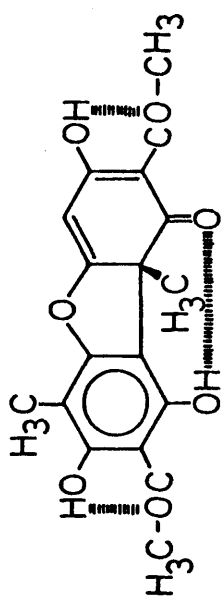
ácido D-úsnico



ácido D-isouásnico



ácido L-úsnico



ácido L-isouásnico

Ag^{2+} , Cu^{2+} (SYERS e ISKANDAR, 1973). Sin embargo, esta actividad parece ser independiente del proceso de nutrición mineral (BROWN, 1976) que se basa en un mecanismo fisico-químico de intercambio iónico (NIEBOER et al., 1976; NIEBOER et al., 1978).

Asimismo son capaces de quelar radioisótopos, preferentemente uranio, torio, estroncio-90 y cesio-137 (PALMER et al., 1963; SALO y MIETTINEN, 1964), por lo cual han sido utilizados como sistemas de prospección.

Pero no solo son capaces de quelar iones del exterior e incorporarlos al talo, sino que pueden actuar sobre sus propios iones internos, regulando de este modo ciertas actividades metabólicas dependientes de cationes. Así, VICENTE y ESTEVEZ (1976) demostraron que la cloroatranorina es capaz de quelar el manganeso e inhibir la fotólisis del agua en cloroplastos aislados del ficolobionte de Evernia prunastri. La cloroatranorina también es capaz de quelar el hierro porfirínico de la catalasa (VICENTE et al., 1975) e incluso el hierro ferredoxínico, lo cual le conferiría un papel desacoplador de las cadenas fotosintéticas de transporte no cíclico de electrones (ESTEVEZ y VICENTE, 1976).

1.1.3. Protección de pigmentos fotosintéticos,-
Conocida la oxidación que sufren los pigmentos cloroplásticos, tanto las clorofilas (KRINSKY, 1968 y 1979), como los carotenos (HASEGAWA et al., 1969; ZINSOU y COSTES, 1973), por acción de una iluminación intensa, podía suponerse que organismos fotoergónicos localizados en habitats expuestos a altas intensidades luminosas presentasen algún mecanismo de protección distinto del meramente anatómico, máxime cuando, como en el caso de los líquenes, éste es prácticamente inexistente. SISTROM et al. (1956) demostraron la viabilidad de un sistema de protección de clorofilas por carotenos, in vivo, en

Rhodopseudomonas spheroides y KRINSKY (1968, 1979) en un sistema aislado de diversos vegetales superiores.

Los líquenes presentan dos mecanismos de protección de los pigmentos fotosintéticos de su ficobionte. Por una parte, la absorción de las radiaciones de menor longitud de onda por parte de las sustancias coloreadas acumuladas en el cortex (SCOTT, 1964; RUNDEL, 1969) y por otra, la asociación de pigmentos fotosintéticos y sustancias líquénicas como es el caso de la formación de un complejo, in vitro, β -caroteno-clorotranorina, en disolución clorofórmica, cuya foto-oxidación es mucho más lenta que la del β -caroteno aislado (ESTEVEZ et al., 1977), aunque, en este caso, la significación fisiológica del proceso descrito puede ser discutible.

1.1.4. Actividad antibiótica.- En el siglo pasado, más de un centenar de preparaciones farmacéuticas en el norte de Europa estaban fabricadas con líquenes (MERETOJA, 1952); por otro lado, los líquenes almacenados en herbarios resistían mejor las invasiones fúngicas que el resto de los vegetales coleccionados, por lo que se intuía que dichos organismos debían contener ciertos compuestos que hicieran inefectivos tales ataques.

La actividad antibiótica de los ácidos úsnicos se ejerce frente a bacterias gram-positivas, como Staphylococcus aureus, Corynebacterium diptheriae, pero no frente a gérmenes gram-negativos (BUSTINZA, 1951a y 1951b; BUSTINZA y CABALLERO, 1948). Los ácidos úsnicos tuvieron uso clínico limitado en el tratamiento de la tuberculosis y su espectro de acción se amplió al obtenerse complejos con otros antibióticos. BUSTINZA (1951c) obtuvo un derivado del ácido L-úsnico y la estreptomycinina muy efectivo frente a Mycobacterium.

VIRTANEN (1954) consiguió sintetizar treinta y cuatro derivados del ácido L-úsnico con diferentes compuestos nitrogenados, obteniendo complejos de amplio

espectro de acción.

En 1956 VIRTANEN et al. obtuvieron un derivado de dicho ácido con cicloserina, muy activo frente a Bacillus subtilis, Staphylococcus carnosus y Mycobacterium phlei.

Complejos de los ácidos úsnicos con acetilurea y alilurea, dieciseis veces más activos frente a M. tuberculosis hominis que el ácido libre, fueron obtenidos por KORTEKANGAS y VIRTANEN (1956). También frente a Mycobacterium presentaron actividad varias hidrazonas sintetizadas por NAITO et al. (1957)

TOMASELLI (1957) y VIRTANEN y KILPIO (1957) lograron sintetizar el usnato de bencildimetil{2-{2-[p-(1,1',3,3'-tetrametilbutil) fenoxi] etoxi} etil} hidróxido amónico, compuesto menos tóxico que los ácidos úsnicos pero que conservaba actividad frente a ciertos hongos causantes de infecciones cutaneas.

Por lo que se refiere al mecanismo de acción, JOHNSON et al. (1950) demostraron la capacidad del ácido L-úsnico para desacoplar la fosforilación oxidativa en células de hígado de rata sin afectar al consumo de oxígeno. Los mismo autores, estudiando los efectos de la droga sobre la respiración de partículas renales de rata, observaron una escasa inhibición en el consumo de oxígeno, con succinato, fumarato y citrato como sustratos, para una concentración del ácido 10^{-6} M, y era incrementado, o no afectado, con glutamato, α -cetoglutarato, malato, piruvato más fumarato o cis-aconitato como sustratos. Para una concentración 10^{-4} M de la droga, la oxidación de estos compuestos era inhibida en un 85%.

A diferencia de otros metabolitos, los ácidos úsnicos son desacopladores de la fosforilación oxidativa y al mismo tiempo inhibidores respiratorios (LARDY et al., 1964), datos definitivos a la hora de evaluar su acción antibiótica. Por un lado, si se inhibe la producción de ATP en el proceso de fosforilación oxidativa, la bacteria infectante detendría sus procesos metabólicos por falta

energía; por otro lado, si se disminuye el consumo de oxígeno, al inhibirse la cadena respiratoria, se anulan los procesos de oxidación de substratos orgánicos y el microorganismo se vería imposibilitado para utilizar los compuestos del huesped como alimento.

Estos no son los únicos procesos primarios sobre los que actúan los ácidos úsnicos. Una concentración del ácido de 10 µg/ml impide, en huevos de Arbacia, las divisiones mitóticas y la fusión nuclear por inhibición de la ADN-asa (MARSHAK y FAGER, 1950). En otros casos, los ácidos úsnicos se han revelado como potentes inactivadores de algunos enzimas del metabolismo bacteriano (VICENTE, 1975).

1.1.5. Acción sobre la permeabilidad celular.- FOLLMANN (1960), estudiando la permeabilidad a la glucosa del alga Trebouxia, ficobionte de Cladonia fulcata, postuló la utilización de las sustancias líquénicas por parte del micobionte a fin de incrementar la permeabilidad de solutos a través de la pared y membrana de dicho ficobionte, controlando de esta manera el aporte de sustancias fotoasimiladas. Estos hechos habían sido antes sospechados para otras células vegetales (VARTIA, 1950) y más tarde corroborados para células animales (FOLLMANN y VILLAGRAN, 1965).

El hecho de que las sustancias líquénicas presenten actividad frente a bacterias gram positivas, pero no frente a gram negativas podría estar relacionado con la composición química de las cubiertas celulares y con la alteración de las condiciones de permeabilidad.

MANSO y VICENTE (1971) observaron un incremento en la población de un cultivo de Proteus mirabilis creciendo en un medio que contenía L-usnato sódico (14,0 µg/ml) y peptona como nutriente orgánico así como un aumento en la cantidad de proteínas por unidad de peso seco para células crecidas sobre urea 40 mM añadida a la droga. Los autores interpretaron estos hechos como una permeación facilitada de nutrientes por parte del

L-usnato sódico y, por tanto una mejor utilización de los mismos en los procesos de síntesis

1.2. Cubiertas celulares de bacterias gram negativas.

1.2.1. Membrana plasmática.- Las bacterias, como formas celulares, están constituidas por un protoplasto protegido por unas estructuras responsables del mantenimiento de la estabilidad osmótica de la célula.

La estructura externa del protoplasto recibe el nombre de membrana plasmática; está constituida, en esencia, por lípidos y proteínas en proporción aproximada 1:5 y presentando del 10 al 26% del peso seco celular (SALTON y FREER, 1965; VORBECK y MARINETTI, 1965).

La mayoría de los componentes lipídicos son fosfolípidos, predominando fosfatidilglicerol, sus aminoácidos derivados y fosfatidiletanolamina. Aparecen en pequeñas cantidades fosfatidilserina, cardiolipina, glicolípidos y diglicéridos. Normalmente también se encuentran carotenoides (SALTON y EHTISHAM-UD-DIN, 1965), así como poliisoprenoides con un demostrado papel en la síntesis del péptidoglicano y de polisacáridos (OSBORN, 1969).

Los lípidos no solo representan una función estructural, sino que son requeridos, fosforilados, en varias reacciones biosintéticas (ENDO y ROTHFIELD, 1969) así como en funciones de transporte (MILNER y KABACK, 1970).

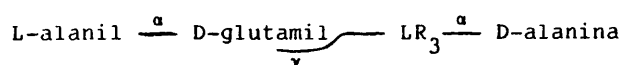
La estructura de esta membrana plasmática se ajusta al modelo de mosaico fluido (SINGER y NICOLSON, 1972) y soporta los enzimas necesarios para realizar funciones biosintéticas, de transporte electrónico y de transporte activo (MINDICH, 1973).

12.2. Pared celular.- Además de la membrana plasmática, las bacterias gram negativas presentan otra estructura más externa, denominada pared celular, de compleja constitución (FREER y SALTON, 1971). En esencia, presenta una capa de péptidoglicano, de 1-2 nm de grosor, separada de la membrana plasmática por un espacio no denso a los electrones y de la parte más externa de la pared, de la membrana externa, por otro espacio más fino.

La membrana externa está constituida por fosfolípidos, lipopolisacáridos y proteínas y estabilizada por cationes Mg^{2+} , confiriendo a la célula una barrera adicional de permeabilidad (LEIVE, 1974). Con una composición diferente de la membrana plasmática (MIURA y MIZUSHIMA, 1968; SCHNAITMAN, 1970), carece de enzimas para su propia síntesis. Sus componentes, así como los del péptidoglicano, se forman en el interior de la célula y en la membrana plasmática (OSBORN et al., 1972a, 1972b; BELL et al., 1971; WHITE et al., 1971).

1.2.2.1. Péptidoglicano.- Está formado por una fina capa de cadenas de glicano unidas por cadenas de péptidos dando una estructura en malla tridimensional (FORMANEK et al., 1974, 1976). Estas cadenas peptídicas contienen aminoácidos D- y L- (GHUYSEN y SHOCKMAN, 1973; ROGERS, 1974).

Las cadenas de glicano formadas por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, presentan ambos componentes alternantes y unidos por enlaces β -1,4 (GHUYSEN, 1968). Ambos componentes presentan unido al carbono 3 un grupo éter-D-lactil. El ácido N-acetilmurámico suele tener substituida la función hidroxilo del carbono 6 por grupos acetil o fosfodiéster (FLECK et al., 1971). Los restos D-lactil en el ácido N-acetilmurámico están substituidos por pequeñas unidades peptídicas (SCHLEIFER y KANDLER, 1972; GHUYSEN, 1968):



pudiendo el resto LR_3 ser:

- un aminoácido neutro (alanina, serina etc.)
- un aminoácido dicarboxílico (glutámico,)
- un ácido diamino (diaminopimélico, ornitina, lisina etc.).

Las unidades peptídicas de glicanos adyacentes se unen covalentemente por puentes entre el carbono terminal del resto L-alanil de una de ellas y uno de los grupos amino del resto LR_3 de otra.

Esta capa de péptido glicano presenta zonas discontinuas, correspondiéndose a los puntos de unión de las membranas plasmática y externa.

1.2.2.2. Membrana externa.- Al igual que la membrana plasmática, la membrana externa está compuesta por lípidos y proteínas. Entre los lípidos, los componentes mayoritarios son fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, apareciendo cardiolipina en pequeñas cantidades. La proporción entre fosfolípidos y proteínas es bastante menor que en el resto de las membranas biológicas (OSBORN et al., 1972a, 1972b). Además presenta componentes únicos, como son lipoproteínas y lipopolisacáridos (DE PETRIS, 1967)

Debido a sus características estructurales y propiedades, la membrana externa no se adapta al modelo de mosaico fluido de SINGER y NICOLSON (1972).

La cara interna de esta membrana está formada por una malla hexagonal proteica (ROSENBUSH, 1974; STEVEN et al., 1977). Presenta un peso molecular de 36.500 y una moderada hidrofobicidad. Se encuentra fuertemente unida al péptidoglicano, pero no covalentemente (ROSENBUSH, 1974), unión que es estimulada por lipopolisacáridos (YU y MIZUSHIMA, 1977). Posee un alto porcentaje de estructuras β (ROSENBUSH, 1974; NAKAMURA y MIZUSHIMA, 1976).

En la matriz de fosfolípidos se encuentran lipoproteínas, polisacáridos y otras proteínas minoritarias. Las lipoproteínas suponen las principales proteínas de la membrana externa. Unas aparecen ligadas covalentemente al péptidoglicano y otras libres. En Escherichia coli, las proteínas libres representan un nivel doble que las ligadas (BRAUN y SIEGLIN, 1970; BRAUN y WOLF, 1970; INOUE et al., 1972; HIRASHIMA et al., 1973). La lipoproteína de E. coli presenta un peso molecular de 7.800 y contiene 58 aminoácidos. El análisis de dicroísmo circular revela una proporción del 80% en α -hélice (BRAUN, 1975). BRAUN et al. (1970) demostraron la carencia de lipoproteína en Proteus mirabilis, aunque posteriormente ha sido señalada su existencia (GRUSS et al., 1975; KATZ et al., 1978). Esta lipoproteína presenta un peso molecular de 5.500 y como aminoácidos característicos presenta glicina y fenilalanina, los cuales están ausentes en lipoproteínas de otras Enterobacteriaceae.

Las lipoproteínas, distribuidas en forma de canales cilíndricos, aportarían a la membrana externa canales de difusión pasiva (INOUE, 1974, 1975). Cada canal estaría compuesto de seis unidades de α -hélice, con los residuos hidrófobos hacia la superficie externa y atravesando toda la membrana externa; dos de las seis moléculas lipoproteicas se unirían covalentemente al péptidoglicano, previniendo a la cubierta celular de movimientos libres de la capa lipídica (INOUE et al., 1976; LEE et al., 1977). Por otro lado, BRAUN (1975) y BRAUN et al. (1976) propusieron una conformación de lipoproteínas cuya longitud estaría rota por un lazo β , atravesando la lipoproteína solamente la mitad de la membrana externa.

Otras proteínas no unidas al péptidoglicano también formarían poros en los que la difusión pasiva estaría permitida, dejando paso a moléculas hidrofílicas de

pequeño peso molecular (NAKAE y NIKAIIDO, 1975; NIKAIIDO et al., 1977; LUTKENHAUS, 1977).

Otra proteína, conocida como Tol G, sensible a tripsina, presenta un moderado grado de hidrofobicidad (GARTEN et al., 1975; VAN ALPHEN, 1977) y un alto contenido en estructuras β (NAKAMURA y MIZUSHIMA, 1976). En gran parte se localiza en la cara externa de la membrana externa y sirve como base de recepción de ciertos fagos (MANNING et al., 1976; VAN ALPHEN et al., 1977 b; DATTA et al., 1977).

También se localizan en la membrana externa de diez a veinte proteínas minoritarias, con pesos moleculares variables entre 15.000 y 83.000, que al igual que la proteína Tol G, se identifican como receptores de fagos (DI RIENZO et al., 1978).

Otro componente de la membrana externa está constituido por lipopolisacáridos, cadenas de polisacáridos unidos a un lípido y conteniendo glucosamina (LUDERITZ et al., 1974). Se encuentran asimétricamente distribuidos, con preferencia en la cara externa de la membrana externa (MUHLRADT y GOLECKI, 1975). Presentan movilidad superficial (MUHLRADT et al., 1974) así como transversal en la zona correspondiente a la discontinuidad del péptidoglicano (MUHLRADT y GOLECKI, 1975).

1.2.2.3. Funciones de la pared celular.- Existe una fuerte asociación entre membrana plasmática, péptidoglicano y membrana externa. La fuerza mecánica y la integridad estructural de la célula bacteriana se atribuye a la membrana externa y al péptidoglicano (GHUYSEN y SHOCKMAN, 1973).

Se ha demostrado en células plasmolizadas la existencia de mesosomas, o canales entre la membrana plasmática y la externa, a través de los cuales, los lipopolisacáridos sintetizados en la membrana celular son translocados atravesando la capa de péptidoglicano a la membrana externa (MUHLRADT et al., 1973; BAYER, 1974; KULPA y LEIVE, 1976).

Las cubiertas celulares suponen una barrera a la difusión (PAYNE y GILVARG, 1968; PAYNE, 1968; NAKAE y NIKAIIDO, 1975; NIKAIIDO, 1976). Nutrientes de bajo peso molecular difundirían a través de los poros proteicos, atravesando la membrana externa y llegando al espacio periplásmico, siendo desde allí transportados activamente al citoplasma. Nutrientes de alto peso molecular requerirían sus propios receptores, proteínas periplásmicas que actuarían de lanzaderas entre los lugares de recepción específicos y los sistemas de transporte activo de la membrana plasmática (DI RENZO et al., 1978). El espacio periplásmico actuaría a modo de reservorio de gran número de enzimas (HEPPEL, 1967)

1.3. Glucosamina-6-P sintetasa.-

La L-glutamina-D-fructosa-6-P transaminasa (GHOSH et al., 1960) o D-fructosa-6-P aminotransferasa (EC.2.6.1.16. para BATES y PASTERNAK, 1965 o E.C. 5.3.1.19 para FASMAN, 1976) es el enzima responsable de la síntesis de glucosamina-6-P, vía de crucial importancia dado que es la iniciación de la ruta biosintética de los aminoazúcares (PHELPS et al., 1970) así como de proteínas séricas (KIKUCHI y TSUKI, 1976a).

En organismos que presentan estructura de pared celular, el derivado acetilado de la glucosamina (DAVISON et al., 1957) es un integrante de las cadenas de glicano que componen el péptidoglicano. Por tanto, cualquier alteración en la actividad enzimática de la transaminasa podría derivar hacia la muerte del organismo, al ser modificada la estructura preservadora de su integridad. La actividad glucosamina-6-P sintetasa es mayor en organismos gram positivos que gram negativos (STRANGE y DARK, 1960), lo cual era esperado a la vista del conocimiento que se tiene sobre el tamaño del péptidoglicano, siendo éste mucho mayor en microorganismos gram positivos.

La actividad enzimática ha sido detectada en una amplia gama de organismos, tanto eucariontes como procariontes. Así, por ejemplo, en Neurospora crassa (LELOIR y CARDINI, 1953), Streptococcus (LONTHER y ROGERS, 1956), E. coli (GHOSH et al., 1960), Bacillus cereus, Micrococcus lysodeikticus y Aerobacter aerogens (STRANGE y DARK, 1960), Bacillus subtilis (CLARKE y PASTERNAK, 1961), hígado de rata (POGELL y GRYDER, 1957), células HeLa (KORNFELD, 1967), Staphylococcus aureus (IMADA et al., 1977) traquea de buey (ELLIS y SOMAR, 1972), hígado humano (KIKUCHI y TSUKI, 1976a) etc.

La reacción es una transaminación utilizando como substratos L-glutamina y hexosa-6-P y dando como productos glucosamina-6-P y ácido L-glutámico, siendo estimulada por la presencia de glutamina (LOWTHER y ROGERS, 1956).

El enzima une primero a la fructosa-6-P y después a la glutamina (WINTERBURN y PHELPS, 1971c), presentando dos puntos de unión fuerte para la primera y un único punto de unión débil para la segunda.

La formación de glucosamina en presencia de glucosa, ATP y L-glutamina fue detectada en extractos libres de células de Streptococcus (LOWTHER y ROGERS, 1956). La hexosa sería previamente fosforilada en presencia de ATP (HARPUR y QUASTEL, 1949) por una hexoquinasa (BROWN, 1951; GRANT y LONG, 1952), produciéndose a continuación la transaminación.

El enzima actúa en presencia de glucosa-6-P y de fructosa-6-P (LELOIR y CARDINI, 1953) en extractos libres de células, perdiéndose progresivamente la afinidad por la glucosa-6-P en paralelo al aumento del grado de purificación del enzima (GHOSH et al., 1960).

La reacción es irreversible y no requiere cofactores y, al igual que todas las reacciones en las que interviene la L-glutamina, se inhibe por 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (BOU-RRILLON, 1969), pudiendo recobrar su actividad al ser

tratada con glutamina o con UDP-N-acetilglucosamina. La presencia de glucosa-6-P protege la estabilidad del enzima en extractos crudos (POGELL y GRyder, 1957), acción que desaparece cuando se utiliza enzima purificado (GRyder y POGELL, 1960). También es inhibido por γ -glutamihidracida, por ácido DL-2-amino-4-(metilsulfonil)-butírico y por O-diazoacetil-L-serina (azaserina) (GHOSH et al., 1960).

El enzima está sometido a retro-inhibición por UDP-N-acetilglucosamina. Esta inhibición ha sido demostrada con enzima procedente de hígado de rata (KORNfeld et al., 1964), de ratón y de células HeLa (KORNfeld, 1967), de traquea de buey (ELLIS y SOMMAR, 1971), de retina de buey (MAZLEN et al., 1969, 1970) y de hígado humano (KIKUCHI y TSUIKI, 1976a). Esta inhibición es de tipo competitivo para la fructosa-6-P y no competitiva para la L-glutamina. El enzima purificado de Neurospora crassa sufre inhibición por UDP-N-acetilglucosamina (ENDO et al., 1970), pero sin alterar la constante de Michaelis para ninguno de los dos sustratos, de lo que se puede deducir que el inhibidor se une al enzima en un sitio diferente al centro activo; es decir, la aminotransferasa presenta un centro de unión alostérico para la UDP-N-acetilglucosamina.

Asimismo, el enzima es inhibido por otros UDP-azúcares, como UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-xilosa y UDP-glucuronato, compitiendo todos por el mismo centro que la UDP-N-acetilglucosamina (WINTERBURN y PHELPS, 1971b). La adición de UTP al sistema inhibido revierte la inhibición (WINTERBURN y PHELPS, 1971b).

Contrastando con lo anteriormente expuesto, el enzima purificado de microorganismos como Salmonella paratyphi A, Bacillus subtilis y E.coli no muestra inhibición por UDP-N-acetilglucosamina (MELO y GLASER, 1966), lo cual podría significar otro mecanismo de regulación del conjunto

del nucleótidos de azúcar, pudiendo estar dicha regulación centrada en ciertas pirofosfatasas, como la UDP-N-acetilglucosamina pirofosfatasa, aislada de E. coli por MELO y GLASER (1966).

Estudiando el efecto de otros compuestos sobre la actividad de la glucosamina-6-P sintetasa, puede observarse que el ATP inhibe no competitivamente al enzima para los dos substratos de reacción, efecto que se ve incrementado por la presencia de Cl_2Mg . El mismo efecto ejerce el CTP y el fósfoenolpiruvato (WINTERBURN y PHELPS, 1971b). La presencia de ADP potencia la inhibición producida por UDP-N-acetilglucosamina. No presentan efecto inhibitorio AMP, GTP, ITP, CoA, acetil-CoA, NADP^+ , NADPH, NAD^+ ni NADH. También es inhibida la transaminasa por cationes divalentes, como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} (WINTERBURN y PHELPS, 1971a).

El enzima presenta inhibición por exceso de substrato para la L-glutamina (MAZLEN et al., 1970; ELLIS y SOMAR, 1971), acción que se ve acentuada para bajas concentraciones de fructosa-6-P (WINTERBURN y PHELPS, 1971b).

La presencia de glucosa altera ciertas propiedades del enzima, provocando la aparición de dos formas interconvertibles y desplazándose el equilibrio hacia una o hacia otra en función de la presencia o ausencia de fructosa-6-P (KIKUCHI y TSUIKI, 1976b). Dichas formas enzimáticas presentan distinto peso molecular y diferente comportamiento frente a digestión con tripsina.

Por otra parte, mutantes de S. aureus y E. coli carenciales de la transaminasa, creciendo en medios suplementados con glucosamina, presentan inhibición del crecimiento por glucosa, provocando una insuficiencia en glucosamina e interrumpiendo la síntesis de la pared celular y, consecuentemente, la muerte del microorganismo. La presen-

cia de cloranfenicol previene el efecto letal, lo cual significaría que una síntesis continuada de proteínas durante la formación de la pared celular defectiva abocaría en la muerte (IMADA et al., 1977). Sin embargo, la presencia de N-acetilglucosamina en los medios de cultivo prevenía la inhibición del crecimiento de los mutantes aún en presencia de glucosa..

Además de esta vía principal, existe otro enzima capaz de interconvertir fructosa-6-P y glucosamina-6-P en presencia de amonio, conociéndose con el nombre de glucosamina-6-P deaminasa o fosfoglucosamina isomerasa. Esta reacción, reversible, tiene el equilibrio desplazado hacia la formación de fructosa-6-P (COMB y ROSEMAN, 1958; FAULKNER y QUASTEL, 1956; ROSEMAN, 1956; SOODAK, 1955). El enzima es inactivado en presencia de N-acetilglucosamina (LELOIR y CARDINI, 1956).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las posibles acciones del ácido L-úsico sobre la permeabilidad de células de Proteus mirabilis a, en principio, fumarato usado como fuente de carbono en los medios. Para ello, se debían estudiar las velocidades de crecimiento, la capacidad de oxidación de fumarato por células crecidas en diferentes fuentes de carbono, la entrada real de fumarato en las células y la posibilidad de inducción de una permeasa específica así como su interacción con la sustancia líquénica. Dado que la oxidación del fumarato se tomaba como un criterio de permeación, era necesario comprobar si el fenol modificaba los enzimas de oxidación del ciclo de KREBS así como la fosforilación oxidativa. Por último se pretendía analizar a nivel estructural los cambios de permeabilidad encontrados.

Ya que uno de estos cambios fue, como se verá, un engrosamiento de las paredes celulares, se trató de iniciar el análisis enzimático de este hecho. Por ello, se escogió el enzima inicial en la cadena biosintética del peptido-glicano, el enzima que sintetiza glucosamina-6-P. Se pretendía entonces estudiar su comportamiento in vivo frente a la presencia del fenol en los medios de cultivo, así como su comportamiento in vitro. Para ello, fue preciso purificarlo, determinar sus constantes cinéticas, temperatura y pH óptimos, así como su peso molecular. También se estudiaron sus espectros de absorción y de fluorescencia y las modificaciones que en estas características de la proteína introducía el ácido L-úsico cuando ambos, fenol y proteína, eran incubados juntos. De este estudio se pretende deducir una explicación de los cambios de permeabilidad y de estructura observados.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Microorganismo utilizado.- Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado Proteus mirabilis, NCIB 5887, bacteria gram negativa, movil, con flagelos peritricos, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (orden Eubacteriales).

Es bacteria productora de ureasa y fenilalanina desaminasa; fermenta dextrosa, pero no lactosa. Su habitat es el tracto intestinal humano y el de algunos animales. Son resistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados (CLANCY, 1973) .

2.2. Medios y condiciones de cultivo.- El microorganismo se mantenía en medios sólidos recomendados por MAGAÑA-PLAZA y RUIZ-HERRERA (1967) cuya composición basal era la siguiente: PO_4HK_2 , 0,7%, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,3%, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01%, glicerol, 0,4 %, peptona, 0,5%, agar, 1,5%.

Los cultivos líquidos se realizaban sobre el medio recomendado por los mismos autores, a los que se adicionaba sulfato amónico como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, resultando con la siguiente composición: PO_4HK_2 , 1,16%, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,5%, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,004%, ClNa , 0,48%, ácido nicotínico, 0,00024%, glucosa, 1,0%, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0,53%. Cuando se especifica, se adicionaba ácido L-úsico (1,4 mg/l o 14,0 mg/l), actinomicina D (50 ó 100 μM) o cloranfenicol (10, 30 ó 100 mg/l).

Para la valoración de la capacidad oxidativa del ácido fumárico, así como para las valoraciones de las actividades enzimáticas isocitrato, succinato y malato deshidrogenasa) se substituyó la glucosa por sales sódicas de los ácidos acético, fumárico o cítrico a una concentración 50 mM

2.3. Estimación del crecimiento.- El crecimiento de las poblaciones bacterianas, en los distintos medios de cultivo, se estimó por medida de la densidad óptica a

910 nm. Se tomaron muestras de 1,0 ml a lo largo del tiempo de experimentación, siendo diluidas en proporción 1:3 (v/v) con agua destilada, previamente a la lectura de la densidad óptica, operación que se realizaba en un Spectronic 20 de Bausch and Lomb. Las medidas de densidad óptica se transformaban en valores de peso seco según una recta patrón, confeccionada con valores conocidos.

Para estimar el crecimiento como incremento en el número de viables se utilizaron, a los mismos tiempos, diluciones seriadas en potencias de diez, siendo las bacterias posteriormente sembradas en medio sólido, en placa petri, donde se mantenían durante 48 horas a 37⁰, al cabo de los cuales se efectuaba el recuento de colonias (COLLINS, 1964).

El crecimiento fue estimado, en todos los casos, para cultivos sobre los diferentes medios líquidos, llevados a cabo a 37⁰ con una agitación continua de 120 oscilaciones por minuto.

2.4. Obtención de extractos libres de células.-

Las bacterias que habían sido sembradas en medios líquidos eran recogidas, a los tiempos indicados, por centrifugación a 16.000 x g durante 15 minutos a 4⁰C, en una centrífuga Beckman J2-21, lavadas dos veces con cloruro sódico 0,1 M para eliminar los restos del medio y resuspendidas en el tampón correspondiente al pH deseado para la actividad enzimática que se fuese, en cada caso, a valorar. Este tampón contenía EDTA 1,0 mM y DTT 1,0 mM para valoración de glucosamina-6-P sintetasa y 2-mercapto etanol 0,14 M para la valoración de los enzimas del ciclo de KREBS.

Las bacterias resuspendidas en esta forma eran sometidas a disrupción por ultrasonidos durante 1 minuto a 8.000 micrones con protección de hielo. El extracto era entonces centrifugado a 29.000 x g durante 30 minutos a 4⁰. El sobrenadante fue utilizado como extracto libre

de células.

Los medios donde habían crecido las bacterias, una vez eliminadas éstas, fueron dializados durante 24 horas frente a tampón fosfato 150 mM, pH 7,5, cambiando cuatro veces el baño de diálisis.

2.5. Medida de la cantidad de proteínas.- La valoración de la cantidad de proteínas se realizó por el método de LOWRY et al. (1951), utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

2.6. Medida de las actividades enzimáticas.-

2.6.1. Actividad glucosamina-6-P sintetasa. Se valoró según el método descrito por GHOSH et al. (1960), realizado de la siguiente manera:

2.6.1.1. Ensayo enzimático. Las mezclas de reacción contenían 40 μ moles de fructosa-6-P, 30 μ moles de L-glutamina, 5 μ moles de EDTA, la cantidad que, en cada caso, se indique de proteína y tampón fosfato 150 mM, pH 7,5 hasta completar un volumen de 2,0 ml. Después de incubar durante 30 minutos a 37⁰, la reacción era detenida por ebullición durante 2 minutos. La mezcla se centrifugaba a 5.000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante era utilizado para valorar los aminoazúcares formados. Del mismo modo se procedía con los diferentes controles.

2.6.1.2. Acetilación de la glucosamina formada. A 0,8 ml de la mezcla de reacción que contenía la hexosamina se le añadieron 0,1 ml de una disolución saturada de bicarbonato sódico y 0,1 ml de anhídrido acético al 5% en agua mantenida en hielo fundente (este reactivo se preparaba instantes antes de ser usado). Después de agitar vigorosamente la mezcla, se mantenía 3 minutos a temperatura ambiente y el exceso de anhídrido acético era destruido por calentamiento en agua hirviendo

durante 3 minutos, enfriándose a continuación a temperatura ambiente.

2.6.1.3. Valoración de la glucosamina acetilada. Se valoró por colorimetría en función de la intensidad de color desarrollado al reaccionar con el reactivo de ERLICH, compuesto por 1,0 g de p-dimetilamino benzaldehído y 1,25 ml de ClH 10 N, diluyendo hasta 100 ml con ácido acético glacial.

Se procedió de la siguiente manera: alícuotas de la disolución de glucosamina acetilada, controles, blancos y patrones eran tratados con 0,1 ml de borato sódico 0,8 M, ajustado a pH 9,0; estas mezclas eran entonces calentadas durante 3 minutos en un baño de agua hirviendo, enfriadas rápidamente e incubadas durante 20 minutos a 37° con 6,0 ml del reactivo de ERLICH. El color desarrollado era inmediatamente medido a 585 nm en un espectrofotómetro Zeiss PM2 DL. Una unidad de actividad específica se definía como μg de producto/mg de proteína y hora.

2.6.2. Actividad málico deshidrogenasa. Fue valorada empleándose el método de OCHOA (1955). Las mezclas de reacción contenían 75 μmoles de tampón Tris-ClH, pH 7,4, 3,0 μmoles de Cl_2Mn , 0,135 μmoles de NADP^+ , 1,5 μmoles de L-malato (ajustado a pH 7,4 con KOH), 0,5 mg de proteína y agua hasta completar un volumen de 3,0 ml. La reacción, y los correspondientes controles, se siguieron a 25°, valorándose la reducción de NADP^+ como incremento en la densidad óptica de las mezclas a 340 nm.

Se utilizó como unidad de actividad específica el $\Delta\text{DO}_{340}/\text{mg}$ de proteína y minuto.

2.6.3. Actividad isocítrico deshidrogenasa. Se empleó el método descrito por KORNBERG (1955). En un volumen de 3,0 ml se mezclaron 100 μmoles de Tris-ClH, pH 7,0, 10 μmoles de Cl_2Mg , 0,5 μmoles de NADP^+ , 0,4 μmoles de DL-isocitrato y 0,5 mg de proteína.

La reacción fue seguida a temperatura de 25°.

estimándose la reducción del piridin nucleótido como incremento en la densidad óptica a 340 nm. Una unidad de actividad específica se definía como $\Delta DO_{340 \text{ nm}}/\text{mg}$ de proteína y minuto.

2.6.4. Actividad succínico deshidrogenasa. Se utilizó el método de BONNER (1955). Las mezclas de reacción contenían 30 μmoles de CNK a pH neutro, 3,0 μmoles de $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$, 40 μmoles de succinato sódico, 300 μmoles de Tris-ClH, pH 7,2 y 0,5 mg de proteína en un volumen final de 3,0 ml.

La reacción, seguida a 25⁰, se estimó como descenso en la densidad óptica a 400 nm en función de la reducción del hexacianoferrato (III) potásico.

Se definía como unidad de actividad específica el $\Delta DO_{400}/\text{mg}$ de proteína y minuto.

2.7. Preparación de vesículas y medida de la fosforilación oxidativa.- Las vesículas de membrana fueron preparadas por el método descrito por TSUCHIYA (1976). Las células aisladas eran incubadas con lisozi-
ma-EDTA durante 30 minutos a 4⁰. Los esferoplastos fueron recogidos por centrifugación a 12.000 x g durante 30 minutos y suspendidos en fosfato potásico 0,1 M conteniendo sacarosa al 20%, con un pH de 6,6. Los esferoplastos fueron lisados por dilución con 20 ml de fosfato potásico 50 mM, pH 6,6 conteniendo ADP 5 mM e incubados a 37⁰. Después de agitar vigorosamente durante 5 minutos, se añadió SO_4Mg hasta una concentración 5 mM y ADNasa hasta alcanzar una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se agitó, de nuevo durante 5 minutos, a temperatura ambiente. La suspensión fue centrifugada a 48.000 x g durante 30 minutos a 4⁰ y el precipitado

se resuspendió en una disolución de fosfato potásico 50 mM que contenía ADP 5 mM. La suspensión fue centrifugada a $3.000 \times g$ durante 15 minutos con el fin de separar las células y los esferoplastos que no hubiesen sido rotos. El sobrenadante fue entonces centrifugado a $60.000 \times g$ a 4° durante 20 minutos en una centrífuga Beckman L2-65B, con rotor SW 50.1. El precipitado fue lavado con fosfato potásico 10 mM, de pH 7,0, que contenía sacarosa 0,28 M y SO_4Mg 5 mM y resuspendido en el mismo tampón hasta alcanzar la concentración de proteína que se indique. Los experimentos a realizar con estas preparaciones lo fueron siempre en el mismo día de la obtención.

2.8. Valoración de la desaparición de glucosa de los medios de cultivo. En los medios de cultivo suplementados con glucosa y sulfato amónico, y una vez eliminadas las células por centrifugación, se procedió a valorar la concentración del azúcar remanente, empleándose para ello el método de la glucosa-oxidasa, según describen SOLS y DE LA FUENTE (1957). Las mezclas de reacción contenían 0,1 ml de una disolución de peroxidasa a una concentración de 1 mg/ml en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0, 0,2 ml de una disolución de glucosa-oxidasa, a una concentración de 2 mg/ml del mismo tampón, 0,3 ml de una disolución de O-dianisidina a concentración de 2 mg/ml del mismo tampón, 1,0 ml del medio a valorar y 1,0 ml del tampón descrito.

La mezcla de reacción, y los correspondientes controles, eran mantenidos a 30° , deteniéndose la reacción por adición de ClH 6 N y midiendo el color desarrollado a 450 nm. Los valores de densidad óptica obtenidos se transformaron en μ moles de glucosa mediante una recta patrón confeccionada con disoluciones de glucosa conocidas.

2.9. Valoración de la desaparición de amonio de los medios de cultivo. En los medios de cultivo suplementados con sulfato amónico y glucosa, se valoró el amonio remanente utilizando para ello el reactivo de Nessler (STANDARD METHODS, 1955). El color desarrollado fue estimado por medida de la densidad óptica a 440 nm, transformando los valores obtenidos en concentraciones de amonio mediante una recta patrón construida con molaridades crecientes de sulfato amónico puro.

2.10. Oxidación de fumarato por células enteras.- El consumo de oxígeno fue valorado empleándose la técnica convencional del respirómetro de WARBURG. Las medidas fueron tomadas a 37° utilizándose aire como fase gaseosa y 0,2 ml de hidróxido potásico al 40% (peso/volumen) colocados en el pocillo central. El compartimento principal del vaso contenía 1,0 mg de células enteras y suficiente cantidad de tampón fosfato 50 mM, pH 6,9 para dar un volumen final de 2,5 ml.

Después de equilibrar, se añadieron 0,5 ml de sal sódica del ácido fumárico, a una concentración 50 mM, sobre las células desde el brazo lateral. El consumo de oxígeno fue seguido durante 30 minutos, al cabo de los cuales se eliminaron las células por filtración de la mezcla a través de filtros Millipore con poros de 0,22 μ de diámetro. El fumarato remanente en el medio fue valorado según el método descrito por ALBERTY et al. (1954), según su coeficiente de extinción molar a 240 nm.

2.11. Resistencia al choque osmótico. La resistencia a choque osmótico se estimó suspendiendo células enteras y lavadas previamente, en agua destilada, manteniéndolas en agitación constante a 37° durante periodos de tiempo que oscilaban entre 0 y 6 horas, midiéndose la densidad óptica de las suspensiones a 910 nm.

2.12. Purificación del enzima glucosamina-6-P sintetasa. Todas las operaciones descritas a continuación se realizaron a 4° y las centrifugaciones a 16.000 x g durante 15 minutos, salvo que se especifique lo contrario.

2.12.1. Preparación del extracto libre de células.

7,0 g de bacterias, en peso seco, fueron recogidos en la iniciación de la fase exponencial de crecimiento, lavadas las células dos veces con cloruro sódico 0,1 M y resuspendidas en 40 ml de tampón fosfato 150 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA y DTT a concentración 1 mM en ambos casos. Las células fueron sometidas a sonicación durante 1 minuto a 8.000 micrones, con protección de hielo, y centrifugadas a 29.000 x g durante 15 minutos. Recogido el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en 10 ml del mismo tampón y centrifugado de nuevo. Ambos sobrenadantes fueron unidos y la mezcla utilizada como extracto libre de células.

2.12.2. Eliminación de ácidos nucleicos. 47 ml del extracto fueron tratados con 10 ml de sulfato de polimixina al 2,0% (ajustados a pH 7,0 con hidróxido amónico). Al cabo de 30 minutos de vigorosa agitación, la mezcla fue centrifugada a 40.000 x g, desechándose el precipitado

2.12.3. Adsorción sobre gel de fosfato cálcico.

El gel de fosfato cálcico fue preparado según las recomendaciones de LEGGET-BAILEY (1967) y equilibrado con tampón fosfato 1 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA y DTT 1 mM. Al sobrenadante de la precipitación con sulfato de polimixina se le añadió el gel en una proporción de 75 mg de peso seco de gel por mg de proteína. Después de mantener la mezcla en agitación durante 20 minutos, fue centrifugada.

La mayor parte de la proteína quedó adsorbida en el precipitado, del que fue extraída por resuspensión del mismo en molaridades crecientes de tampón fosfato, pH 7,5, variando desde 10 a 600 mM, conteniendo en todos los casos, EDTA y DTT a las concentraciones indicadas anteriormente. La mayor actividad específica fue eluida en la fracción 50 mM.

2.12.4. Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa. La DEAE-celulosa fue preparada por el método descrito por SEUBERT-REMBERGER (1961) equilibrándose con tampón fosfato 10 mM, pH 7,5 y cloruro sódico 20 mM, conteniendo EDTA y DTT. La fracción obtenida como eluato del gel de fosfato cálcico fue concentrada a 5 ml por ultrafiltración en Amicón, utilizando una membrana UM-2. A continuación fue cargada en una columna de 2,5 cm de diámetro por 10,0 cm de altura conteniendo 3 g de DEAE-celulosa. La columna fue entonces lavada sucesivamente con disoluciones de tampón fosfato 8 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA y DTT así como molaridades crecientes de ClNa, desde 50 mM a 500 mM. La mayor actividad enzimática eluyó de la columna en la fracción que contenía ClNa 150 mM.

2.13. Estimación del ácido L-úsnico ligado al enzima. Alícuotas de ~250 µg de enzima purificado fueron incubadas durante 5 minutos a 37° con ácido L-úsnico a concentraciones variables (0,6-25 µg) en un volumen final de 2,0 ml completado con tampón fosfato 150 mM de pH 7,5. Al cabo de este tiempo, la proteína fue adsorbida sobre gel de fosfato cálcico en las proporciones indicadas en el apartado 2.12.3. y centrifugada después a 10.000 x g durante 30 minutos. En el sobrenadante se valoró el ácido úsnico libre, según su coeficiente de extinción a 290 nm. Los valores de la densidad óptica

fueron transformados en μg de ácido L-úsnico mediante una recta patrón elaborada con concentraciones conocidas del fenol. Los resultados obtenidos se representaron según el método de SCATCHARD (1950).

2.14. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

2.14.1. Sistema de gel en placa en gradiente lineal de poliacrilamida. Los geles en gradiente lineal abarcaron desde un 5 a un 15% de poliacrilamida. La relación acrilamida/bisacrilamida empleada fue de 38/1. Como catalizadores de la polimerización se emplearon TEMED al $12 \cdot 10^{-2}$ por ciento y persulfato amónico al $1,25 \cdot 10^{-2}\%$ para el 5% de poliacrilamida y de $1,0 \cdot 10^{-2}\%$ para el 15%. El tampón empleado fue Tris-ClH 0,38 M, pH 8,7.

La polimerización se efectuó a temperatura ambiente durante una hora. El gel de concentración de la muestra fue realizado al 4% de poliacrilamida. En las cubetas se empleó tampón tris-glicina 37,5 mM, pH 8,3. Las muestras, antes de ser introducidas en el gel, se mezclaron con glicerol al 25% (v/v). Como indicador se empleó azul de bromofenol al 1%.

La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, en vertical, a tensión constante de 100 v para la entrada de la muestra y 150 v para el resto del recorrido. La migración fue hacia el ánodo.

Los geles fueron teñidos con azul Coomassie R-250, utilizando para ello dos disoluciones (FAIRBANKS et al., 1971), compuestas por:

1ª azul Coomassie al 0,025%, isopropanol al 25% y ácido acético al 10%. En ella se mantuvo el gel sumergido durante 24 horas.

2ª azul Coomassie al 0,0025%, isopropanol al 10% y ácido acético al 10%. En ella, el gel se mantuvo durante 12 horas.

El fondo de los geles fue desteñido manteniéndolos en ácido acético al 10% durante varios horas.

2.14.2. Sistema de gel en placa en gradiente lineal de poliacrilamida con SDS. El gradiente lineal de poliacrilamida se contruyó desde un 5% a un 15%, usando un gel de concentración de muestra al 4%. La relación acrilamida/bisacrilamida fue la misma que en el apartado anterior, así como las proporciones de TEMED y de persulfato amónico.

El tampón gel utilizado fue Tris-ClH 0,38 M, pH 8,7 más SDS al 0,1% (p/v) y DTT 1 mM. Las cubetas llevaron tampón Tris-glicina 37,5 mM, pH 8,3 más SS al 1% (p/v) y DTT 1 mM.

Las muestras del enzima fueron tratadas durante 5 minutos a 80° con SDS en proporción de 6 g de detergente por g de proteína, en un volumen final de 80 µl, para no alcanzar la concentración miscelar crítica del SDS, y DTT 5 mM. Antes de ser incluidas las muestras en el gel, se les añadió glicerol al 25% (v/v).

2.15. Determinación del peso molecular de la glucosamina-6-P sintetasa. El peso molecular del enzima se determinó según su movilidad relativa en electroforesis (LARSKY, 1978), representando el logaritmo del peso molecular frente a dicha movilidad y utilizando como patrones proteínas de peso molecular conocido. La movilidad relativa fue calculada de acuerdo con lo descrito por WEBER y OSBORN (1969).

2.16 Preparación de células para microscopía electrónica. Las preparaciones de las bacterias para su observación al microscopio electrónico fueron llevadas a cabo por fijación de dichas células en glutaraldehído a 25° durante 2 horas; al cabo de este tiempo las células fueron post-fijadas en tetróxido de osmio y después tra-

tadas citrato de plomo y acetato de uranilo, según el método descrito por HIGGINGS (1972)

2.17. Espectroscopía.

2.17.1. Espectros de absorción ultravioleta.

El espectro de la sintetasa purificada, a una concentración de 1 mg/ml, fue realizado en un espectrofotómetro Varian Techtron 635 manteniendo los siguientes factores: ancho de la rendija, 0,2 mm; velocidad del registrador, 50 nm/minuto; velocidad de barrido, 25 nm/minuto y sensibilidad de 0,1 v. El espectro del ácido L-úsnico fue medido de la misma manera.

2.17.2. Espectros de fluorescencia: emisión y excitación. El espectro de fluorescencia del enzima purificado, a concentración de 0,1 mg/ml fue medido en un espectrofluorímetro diferencial absoluto FICA 55 MK II. Los factores utilizados para el espectro de emisión fueron: ancho de banda del monocromador de excitación, 7,5 nm; ancho de banda del monocromador de emisión, 2,5 nm; ganancia del amplificador, 50; respuesta del registrador, 5 mv/cm.

Los correspondientes a la estimación del espectro de excitación fueron: ancho de banda del monocromador de emisión y de excitación, 7,5 nm; ganancia del amplificador, 10; velocidad de barrido, 5 nm/minuto; respuesta del registrador, 5 mv/cm.

Addenda a 2.7. La fosforilación oxidativa fue estimada a 23° e iniciada por adición de fumarato. La reacción fue parada por adición de ácido perclórico frío, quitada la proteína y estimado el ATP formado por acoplamiento a luciferina-luciferasa (TSUCHIYA, 1976)

3. RESULTADOS

3.1. Efecto del L-usnato sobre el crecimiento de Proteus mirabilis y sobre la capacidad de oxidación del fumarato.

Las bacterias fueron sembradas en medios líquidos suplementados con la sal sódica de los ácidos acético, fumárico o cítrico, a una concentración de 50 mM, en presencia o ausencia de L-usnato a dos concentraciones distintas, 1,4 µg/ml ó 14 µg/ml. El crecimiento de la población bacteriana fue estimado bien como incremento en el peso seco de los cultivos, bien como incremento en el número de células viables. En la figura 2 se observa una larga fase de latencia que abarca al menos las cinco primeras horas de experimentación para los cultivos realizados sobre acetato o sobre fumarato, fase de latencia que se extiende hasta las 10 horas de experimentación cuando el microorganismo ha sido sembrado sobre citrato. En los dos primeros casos, el número de viables incrementa en forma paralela al incremento en peso, mientras que en el tercero, la invariabilidad del peso seco a lo largo de las diez horas de cultivo va acompañada de un descenso en el número de viables que se estabiliza a partir de la quinta hora.(figura 3).

La inclusión de L-usnato a la menor concentración reseñada modifica este comportamiento, produciéndose un crecimiento activo, tanto entendido como aumento del peso seco del cultivo como en aumento del número de viables, desde las primeras horas después de la siembra (figuras 4 y 5). Cuando la droga es incluida a la mayor concentración citada se detecta un aumento del peso seco mucho más rápido y de mayor entidad que en los casos anteriores (figura 6), aunque el incremento en el número de viables va precedido de una disminución en las primeras horas cuando se utilizan fumarato o

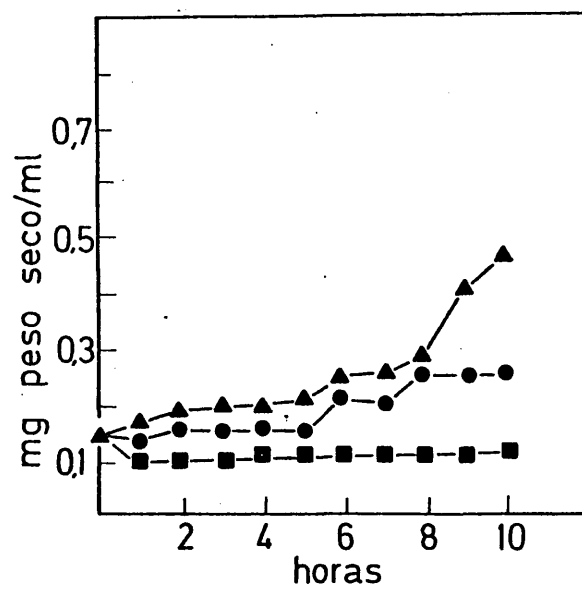


Figura 2. Incremento en el peso seco de cultivos de Proteus mirabilis creciendo sobre (▲) acetato, (●) fumarato o (■) citrato 50 mM.

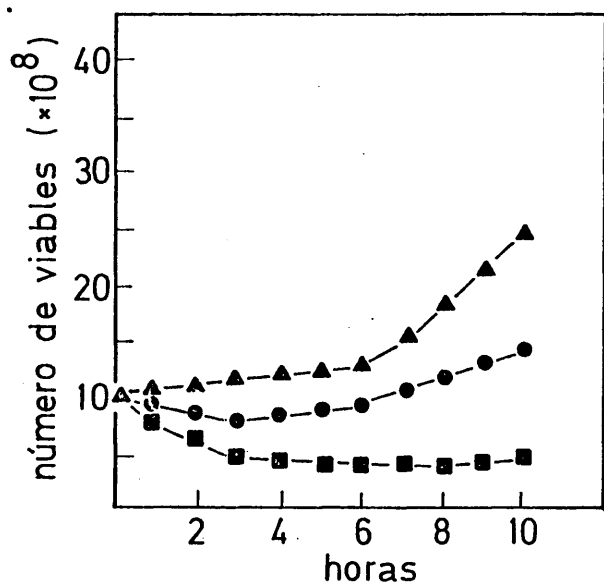


Figura 3. Evolución del número de viables en cultivos de *Proteus mirabilis* sembrados sobre medios que contienen acetato, fumarato o citrato como fuentes de carbono. Se utilizan los mismos símbolos que en la figura 2.

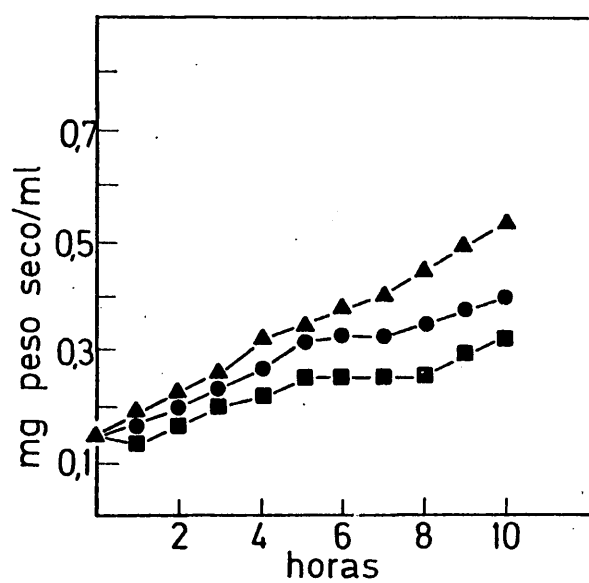


Figura 4. Incremento en el peso seco de cultivos realizados sobre acetato, fumarato o citrato en presencia de L-usnato a una concentración 1,4 $\mu\text{g/ml}$.

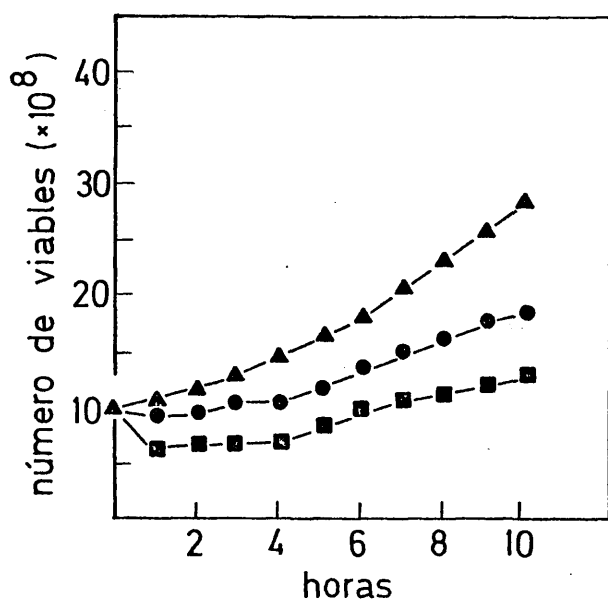


Figura 5. Variación en el número de viables para cultivos llevados a cabo en presencia de acetato, fumarato citrato y L-usnato a una concentración de 1,4 $\mu\text{g/ml}$.

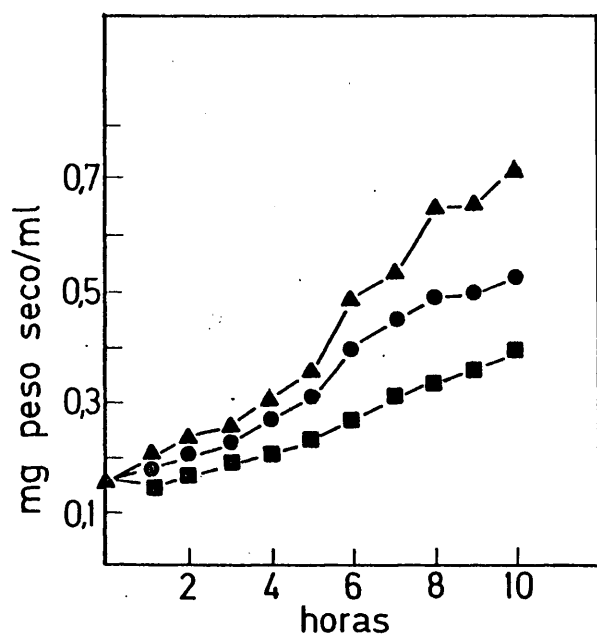


Figura 6. Incremento en el peso seco de cultivos realizados sobre acetato, fumarato o citrato en presencia de L-usnato 14,0·µg/ml.

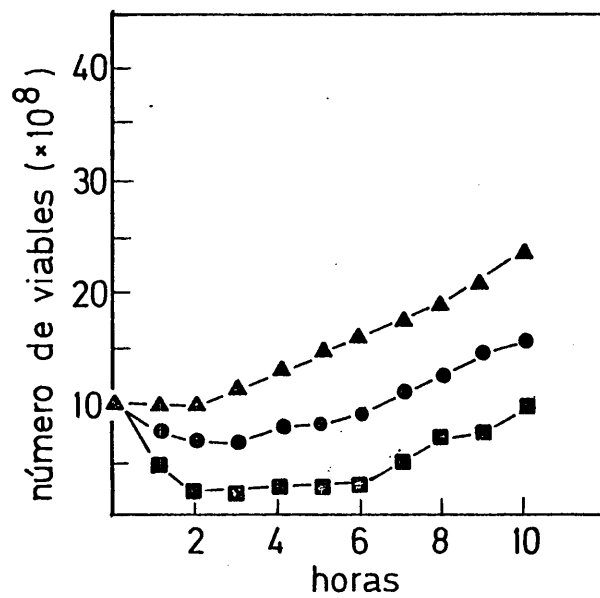


Figura 7. Variación en el número de viables para cultivos realizados sobre acetato, fumarato o citrato en presencia de L-usnato a una concentración de 14,0 µg/ml.

citrato. Para todos los tratamientos, el mayor nivel de crecimiento se detectó cuando la fuente de carbono suministrada al medio fue acetato.

Los resultados referentes a la capacidad de oxidar fumarato, estimada en función de consumo de oxígeno por células enteras así como en la cantidad de fumarato remanente en las mezclas de reacción se muestra en la Tabla I. Las únicas células que presentan capacidad para oxidar fumarato son aquellas que han crecido sobre esta fuente de carbono. La adición de úsnico en la menor concentración utilizada modifica estos resultados. En estas condiciones, el fumarato es eficientemente oxidado por las células crecidas tanto sobre fumarato como sobre acetato y escasamente por las bacterias sembradas sobre citrato. Cuando la droga es incluida en el medio en una concentración de 14,0 $\mu\text{g/ml}$, se observa un consumo de oxígeno muy superior, y por tanto, mayor capacidad de oxidar fumarato por parte de las células crecidas sobre cada una de las fuentes de carbono. El fumarato remanente en las mezclas de reacción, valorado en función de su coeficiente de extinción molar y una vez eliminadas las células por filtración, muestra una evolución concordante con la observada para el consumo de oxígeno

3.2. Efecto del L-usnato sobre los niveles de actividad de deshidrogenasas del ciclo de KREBS.

Las células fueron cultivadas sobre los medios indicados, conteniendo o no L-usnato y las diferentes deshidrogenasas fueron valoradas en extractos libres de células, al tiempo cero y a las diez horas de cultivo. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla II.

La actividad isocitrato deshidrogenasa muestra un ligero incremento en función del tiempo de cultivo para cualquiera de las fuentes de carbono utilizadas

TABLA I. Oxidación de fumarato por células intactas de Proteus mirabilis creciendo sobre diversas fuentes de carbono. Cada valor es la media de 4 repeticiones

Fuente de carbono en el medio	L-usnato en el medio (µg/ml)	oxidación de fumarato	
		Oxígeno consumido (µl/min)	Fumarato remanente en las mezclas (µmol)
Fumarato	---	0,49 ± 0,03	24,2 ± 1,52
	1,4	2,73 ± 0,31	21,1 ± 1,40
	14,0	13,96 ± 1,10	6,2 ± 0,61
Acetato	---	0,00	24,7 ± 1,58
	1,4	2,00 ± 0,19	22,0 ± 1,49
	14,0	9,74 ± 0,94	11,6 ± 1,11
Citrato	---	0,00	24,8 ± 1,76
	1,4	0,50 ± 0,02	24,3 ± 1,82
	14,0	8,56 ± 0,92	13,9 ± 1,23

TABLA II. Niveles de varios enzimas del ciclo de KREBS en extractos acelulares de Proteus mirabilis. Cada valor es la media de cuatro repeticiones.

Fuente de L-usnato carbono en el medio el medio ($\mu\text{g/ml}$)	Actividades enzimáticas (unidades)					
	Isocitrato deshidrogenasa		Malato deshidrogenasa		Succinato deshidrogenasa	
	a tiempo cero	a 10 h	a tiempo. cero	a 10 h	a tiempo cero	a 10 h
Fumarato	---	0,46 \pm 0,06	0,53 \pm 0,05	0,002	0,004	0,33 \pm 0,02
	1,4		0,53 \pm 0,05		0,002	0,10 \pm 0,01
	14,0		0,48 \pm 0,05		0,004	0,28 \pm 0,04
						0,30 \pm 0,03
Acetato	---	0,30 \pm 0,03	0,49 \pm 0,06	0,001	0,001	0,04 \pm 0,01
	1,4		0,50 \pm 0,05		0,001	0,34 \pm 0,02
	14,0		0,44 \pm 0,05		0,001	0,22 \pm 0,03
Citrato	---	0,34 \pm 0,03	0,39 \pm 0,03	0,001	0,002	0,20 \pm 0,01
	1,4		0,38 \pm 0,03		0,002	0,13 \pm 0,01
	14,0		0,39 \pm 0,03		0,002	0,12 \pm 0,01

La inclusión en los medios de L-usnato a las dos concentraciones señaladas no modifica los niveles de actividad. En lo referente a la málaato deshidrogenasa, no se aprecia ningún cambio en los niveles de actividad para las células crecidas en los medios expresados, ni en presencia ni en ausencia de la droga. Por el contrario, la succinato deshidrogenasa presenta un descenso de actividad en función del tiempo de cultivo para los tres medios utilizados. Este descenso es mayor en los cultivos controles sobre fumarato y sobre acetato que en el caso de existir suplemento de L-usnato. Por el contrario, la disminución de actividad es mayor para los cultivos realizados sobre citrato en presencia de L-usnato que cuando está ausente la droga.

Ni el consumo de oxígeno ni la fosforilación oxidativa cambian usando vesículas de membrana aisladas de células hechas crecer en presencia o en ausencia de la droga (ver Tabla III).

3.3. Modificación de la resistencia osmótica en células cultivadas sobre L-usnato.

Los cambios en la resistencia a choque osmótico se estudiaron en células que habían crecido durante 10 horas en medios suplementados con fumarato en presencia de L-usnato a una única concentración de 14,0 $\mu\text{g/ml}$. Las variables consideradas fueron la densidad óptica a 910 nm y el número de células viables. En la figura 8 se observa un descenso en la densidad óptica paralelo a la disminución del número de viables, descenso que es notablemente menor para los microorganismos crecidos en presencia de L-usnato que para las bacterias cultivadas en ausencia de la sustancia líquénica.

TABLA III. Consumo de oxígeno y formación de ATP por vesículas de membrana aisladas de Proteus mirabilis. Cada valor es la media de tres repeticiones.

L-usnato incluido en el medio de cultivo (μg/ml)	Consumo de oxígeno (μmol/mg proteína y minuto)	ATP formado (μmol/mg pro- teína y min)
---	1,55 ± 0,07	4,75 ± 0,30
1,4	1,62 ± 0,10	5,01 ± 0,50
14,0	1,52 ± 0,09	4,52 ± 0,40

1 mg de vesículas de membrana cebadas con ADP son suspendidas en tampón fosfato 50 mM, sacarosa 0,28 M y Cl_2Mg 5 mM. La reacción se inicia por adición de fumarato 20 mM (en un volumen final de 3,0 ml) y seguida durante 5 minutos.

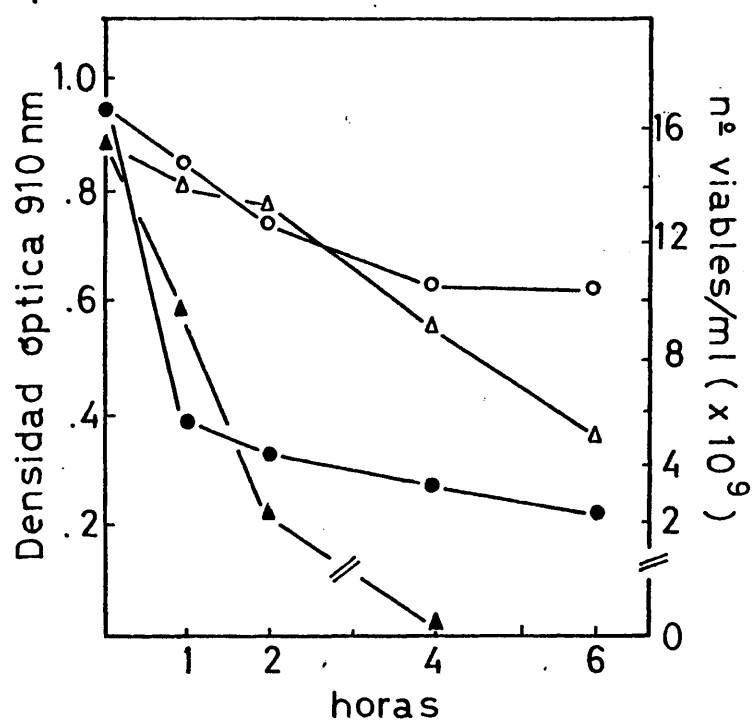


Figura 8. Descenso en la densidad óptica a 910 nm (círculos) y en el número de células viables (triángulos) de bacterias resuspendidas en agua destilada. (●, ▲) células sembradas sobre fumarato; (○, △) células sembradas sobre fumarato y suplementadas con L-usnato (14,0 µg/ml).

3.4. Observación de las células al microscopio electrónico.

Las bacterias sembradas sobre fumarato, en medios suplementados o no con L-usnato (14,0 $\mu\text{g/ml}$) fueron preparadas según se especifica en materiales y métodos y observadas al microscopio electrónico. La figura 9 muestra células que han crecido en medios control, en las que puede observarse la membrana plasmática, el espacio periplásmico ampliado por plasmolisis debida al proceso de preparación de las muestras, y la pared celular. Las bacterias cultivadas en medios que contienen L-usnato muestran la membrana plasmática parcialmente destruida, en la zona polar en las formas L, en una zona indeterminada en las formas S, destrucción que siempre está acompañada por un engrosamiento de la pared, justo en la zona que se corresponde con la disrupción mencionada. (figura 10).

3.5. Efecto del ácido L-úsico sobre el crecimiento de Proteus mirabilis y sobre la actividad glucosamina-6-P sintetasa.

Las bacterias fueron sembradas en medios líquidos suplementados con glucosa 50 mM y sulfato amónico 40 mM en presencia de ácido L-úsico a concentración de 14,0 $\mu\text{g/ml}$. El crecimiento en estas condiciones, estimado como incremento en el peso seco del cultivo y en número de células viables, se representa en la figura 11. En ella puede observarse una fase de latencia en las horas iniciales del cultivo, seguido de un incremento progresivo a lo largo de las siguientes horas de experimentación, en cuanto a peso seco se refiere. En cuanto al número de viables, esta fase de latencia se corresponde con una disminución solo para los cultivos realizados en presencia de la droga.

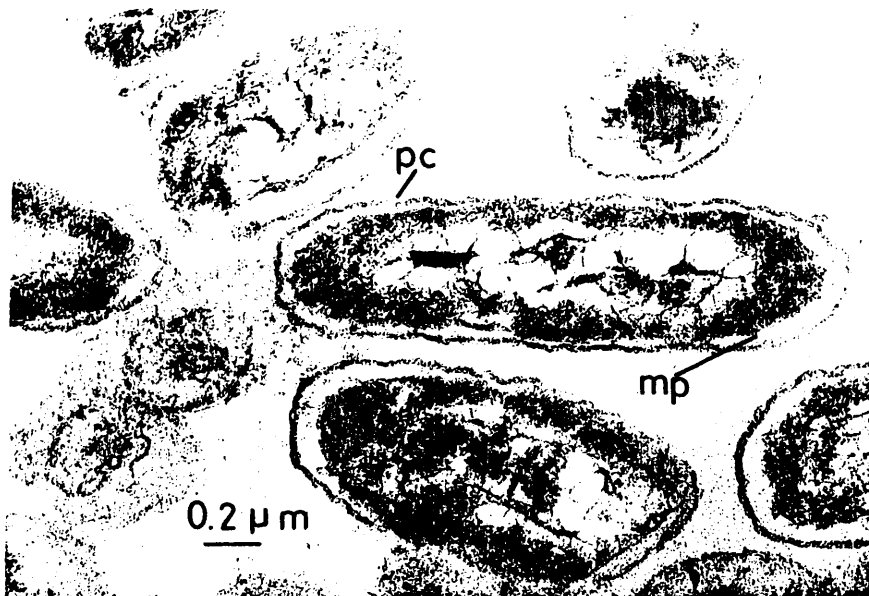


Figura 9. Células de Proteus mirabilis cultivadas durante 10 horas sobre fumarato 50 mM. mp = membrana plasmática; pc = pared celular.

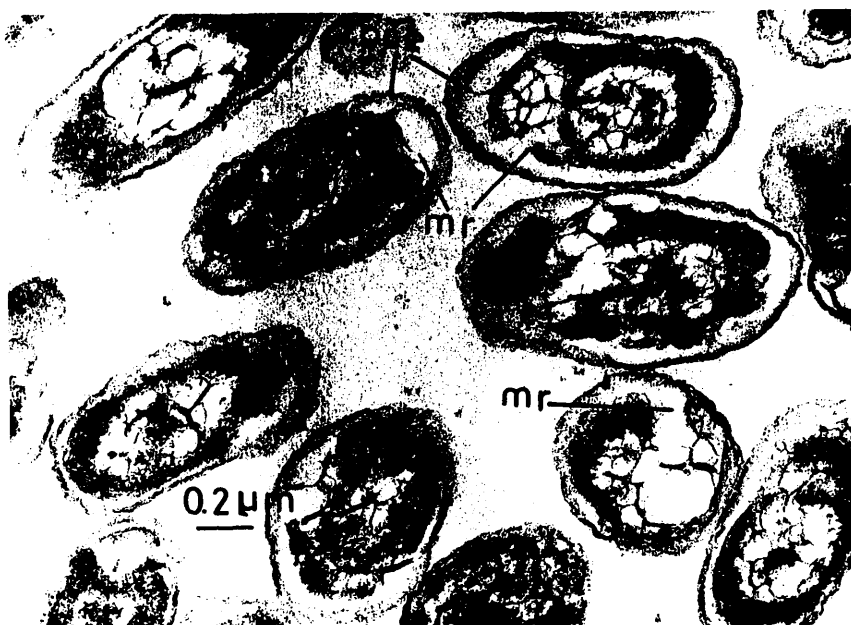


Figura 10. Células de Proteus mirabilis cultivadas durante 10 horas sobre fumarato 50 mM y L-usnato a una concentración de 14,0 μg/ml. mr= membrana plasmática rota; pce = pared celular engrosada.

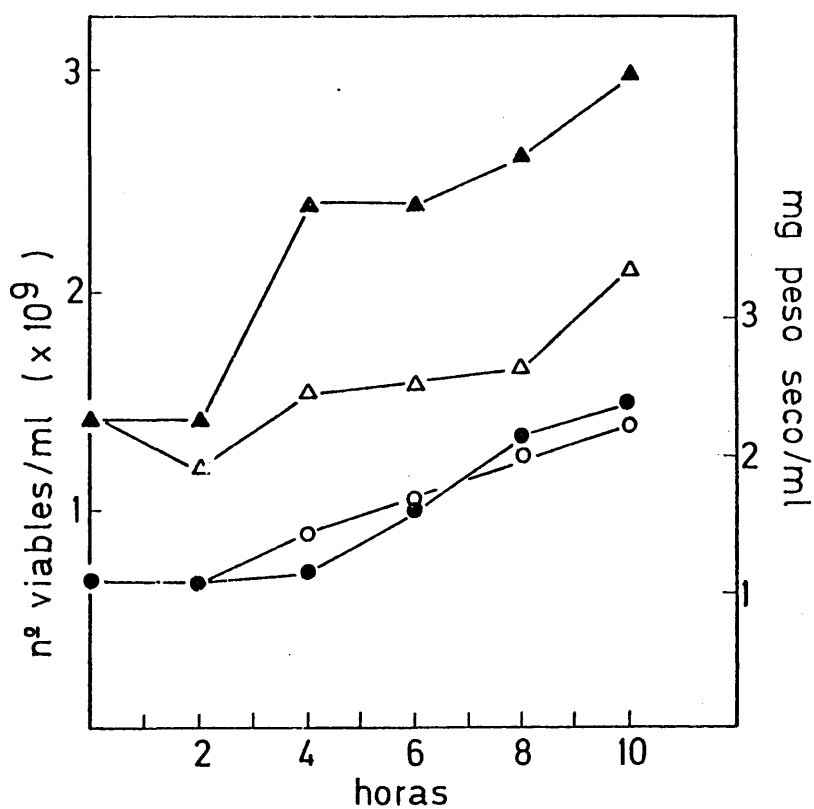


Figura 11. Crecimiento de *Proteus mirabilis*, estimado como peso seco (círculos) o como número de viables (triángulos). Las bacterias han sido sembradas sobre glucosa 50 mM y sulfato amónico 40 mM (●,▲) o en el mismo medio suplementado con ácido L-úsico (○,△)

La presencia de la substancia líquénica no modifica substancialmente este comportamiento, observándose un incremento en el peso seco, respecto al cultivo control, a lo largo de las ocho primeras horas de experimentación y correspondiéndose con un menor número de viables.

Los niveles de actividad del enzima responsable de la síntesis de glucosamina-6-P fueron valorados tanto en los extractos libres de células como en los medios de cultivo, según se especifica en materiales y métodos. La actividad enzimática para los extractos se muestra en la figura 12. En ella puede observarse un aumento progresivo de la actividad a lo largo del tiempo de experimentación, incremento que es ligeramente superior para bacterias cultivadas sobre ácido L-ús-nico durante las ocho primeras horas. Los niveles de enzima excretado al medio (figura 13) presentan un comportamiento paralelo, aunque la excreción se ve significativamente disminuida cuando el cultivo se ha llevado a cabo en presencia de la substancia líquénica

3.6. Estimación del consumo de glucosa y sulfato amónico.

En las condiciones anteriormente descritas, se ha valorado la desaparición de glucosa y sulfato amónico de los medios de cultivo por estimación directa de los remanentes, como parámetro de su posible metabolización por las bacterias y como índice que asegure su persistencia en los medios a lo largo de todo el periodo de experimentación, de manera que las actividades enzimáticas encontradas no se pudieran malinterpretar en ningún momento por carencia de nutrientes.

La cantidad de glucosa remanente fue valorada

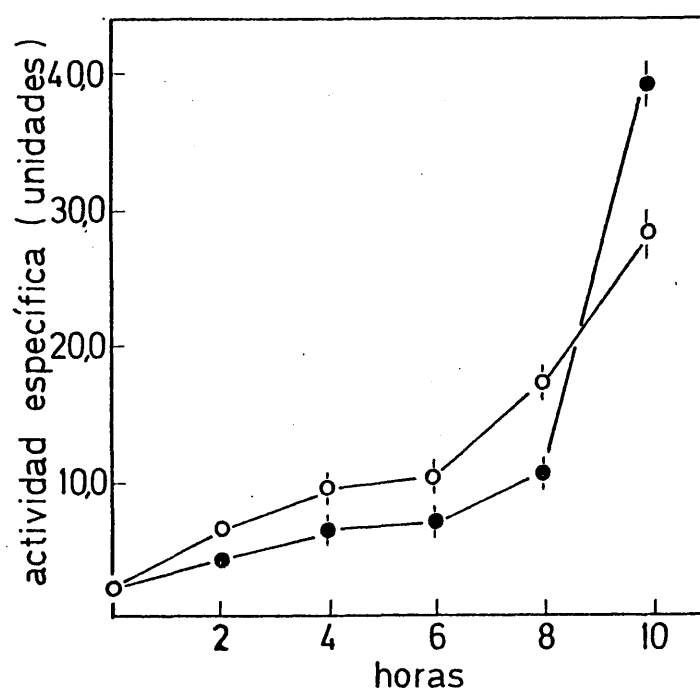


Figura 12. Evolución de la actividad glucosamina-6-P sintetasa en extractos acelulares de bacterias cultivadas en presencia (o) o en ausencia de ácido L-úsico (●).

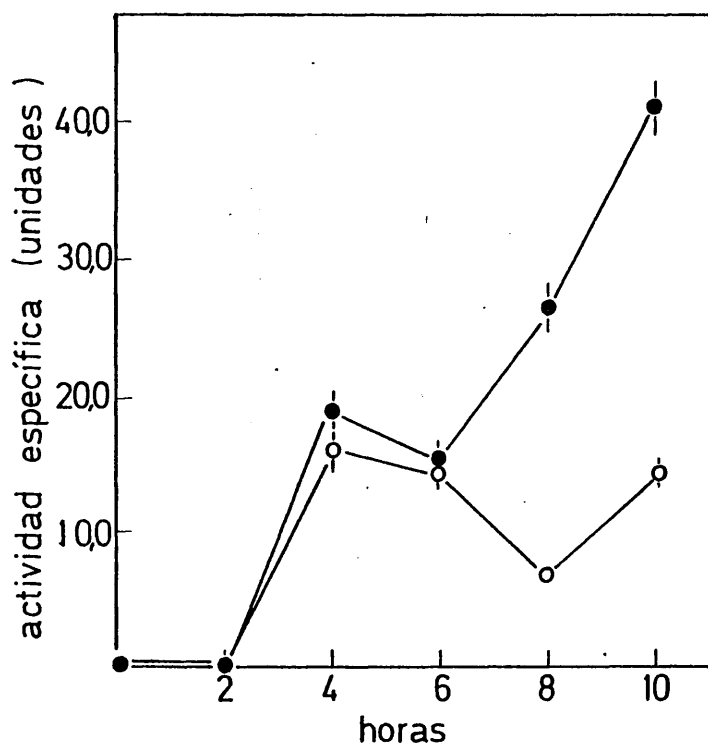


Figura 13. Evolución de la actividad glucosamina-6-P sintetasa excretada al medio por células cultivadas en presencia (o) o ausencia (●) de la droga.

por el método de la glucosa-oxidasa. En la figura 14 se observa un rápido consumo del azúcar en las dos primeras horas subsiguientes a la siembra, comportamiento que prosigue más atenuado durante el resto del tiempo de cultivo, consumiéndose al cabo de 10 horas aproximadamente la mitad de la glucosa inicial en los medios control. La presencia del ácido L-úsnico en el medio proporciona un comportamiento paralelo, apreciándose un consumo de glucosa levemente menor que en el caso anterior para el tiempo final del cultivo.

Los niveles de amonio remanente, valorados por el método de Nessler, se representan en la figura 15. Tanto en presencia como en ausencia de la substancia líquénica se observa un rápido descenso en los niveles de amonio en los medios de cultivo para las dos primeras horas atenuándose a continuación.

Substituyendo el sulfato amónico por L-glutamina 40 mM como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo, el crecimiento de las células se detiene completamente para las diez horas de experimentación, y la conducta del enzima cambia drásticamente. Mientras que no se detecta actividad enzimática en los extractos procedentes de las células, un alto nivel de excreción del actividad al medio es puesto de manifiesto (figuras 16 y 17). Sin embargo, la adición de ácido L-usnico en presencia de L-glutamina a los medios de cultivo hace incrementar notablemente la actividad correspondiente a las células (figura 16) mientras que disminuye drásticamente el nivel de actividad encontrado en los medios de cultivo (figura 17).

3.7. Efecto de la actinomicina D sobre el crecimiento y la actividad glucosamina-6-P sintetasa.

El efecto de un inhibidor de la transcripción

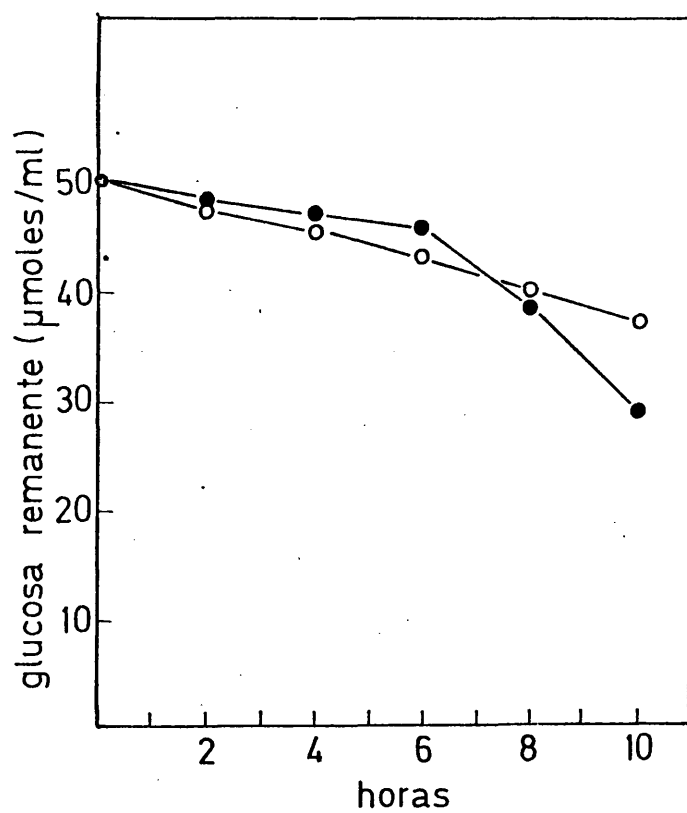


Figura 14. Niveles de glucosa remanente en los medios de cultivo en ausencia (●) o presencia (○) de ácido L-úsico.

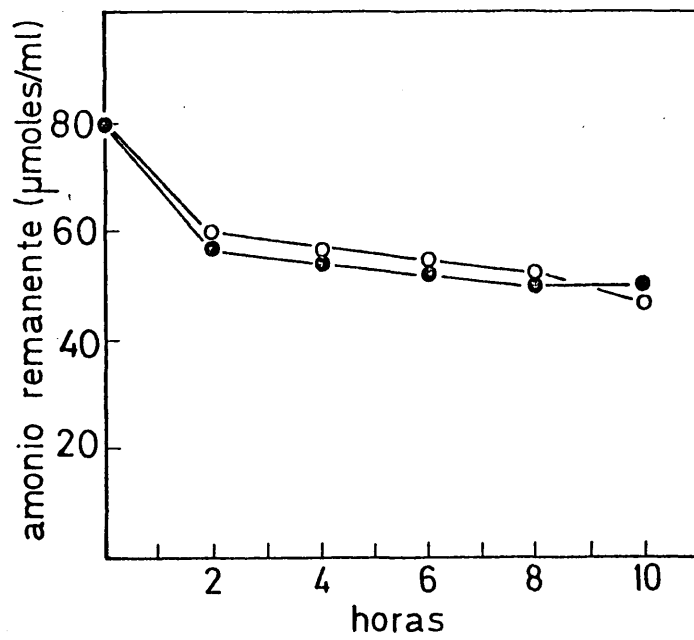


Figura 15. Niveles de amonio remanente en los medios de cultivo en presencia (o) o ausencia (●) de ácido L-úsnico.

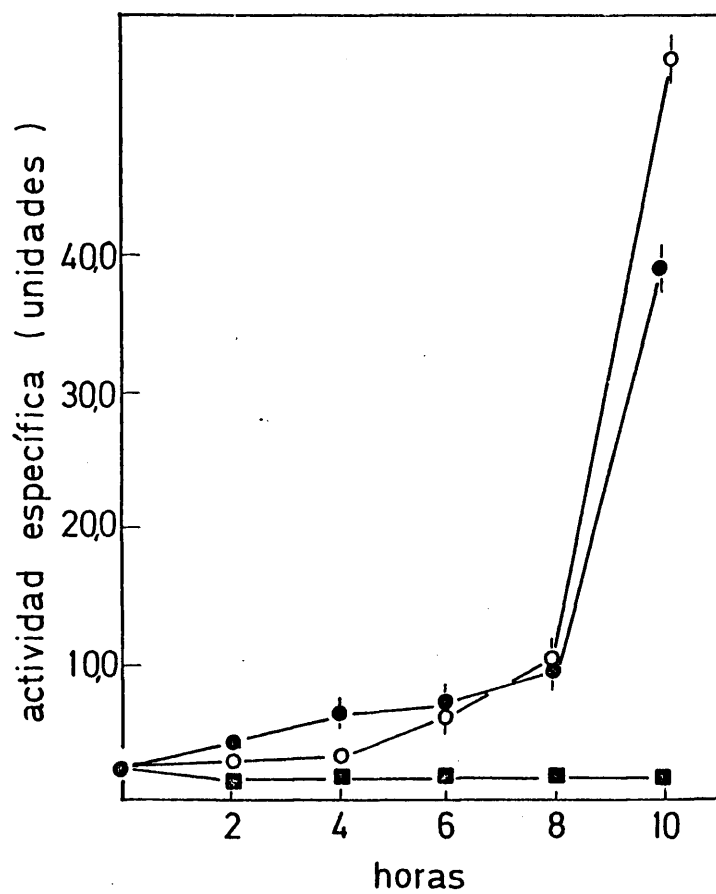


Figura 16. Efecto de la substitución del sulfato amónico por L-glutamina 40 mM en los medios sobre la actividad del enzima en extractos. (●) control; (■) células sembradas sobre L-glutamina; (○) células sembradas sobre L-glutamina + ácido L-úsico.

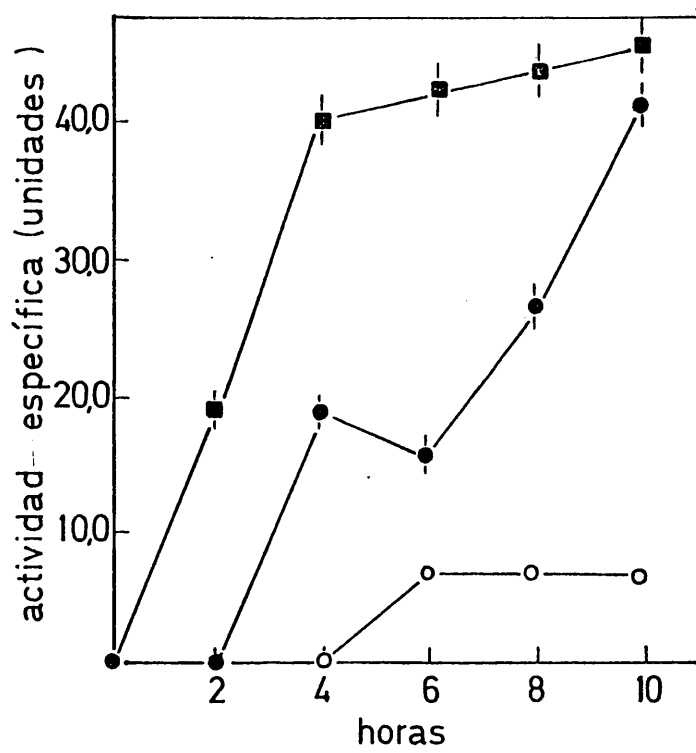


Figura 17. Excreción de glucosamina-6-P sintetasa a los medios de cultivo que contenían sulfato amónico (●), L-glutamina (■) o L-glutamina + ácido L-úsnico.(○).

fue estudiado por adición a los medios de cultivo de actinomicina D a distintas concentraciones, tanto en presencia como en ausencia de L-usnato.

La figura 18 muestra el efecto del antimetabolito sobre el crecimiento de Proteus mirabilis. La adición de actinomicina D en el momento de la siembra, a concentraciones 50 μ M ó 100 μ M provoca una total inhibición del crecimiento bacteriano a lo largo de las diez horas de cultivo (figura 18.1). Cuando la adición se realiza en presencia de ácido L-úsico no se modifica este comportamiento para una concentración 50 μ M de actinomicina D; sin embargo, para una concentración 100 μ M, se produce una inhibición del crecimiento durante las seis primeras horas de cultivo, incrementando el peso seco rápidamente para los tiempos siguientes y alcanzándose algo más del doble del peso inicial al término del tiempo utilizado (figura 18.2).

Los valores de actividad glucosamina-6-P sintetasa se representan en la figura 19. El suministro de actinomicina D, en medio normal, a una concentración 50 μ M permite un aumento de actividad que alcanza su máximo a las seis horas de cultivo, decayendo a continuación hasta llegar a anularse por completo al cabo de las diez horas. Si la concentración del antimetabolito es doble que la anterior, la inhibición de la síntesis del enzima se hace neta en las seis primeras horas de cultivo, iniciándose una débil recuperación a partir de este momento.

Cuando la actinomicina D se adiciona a medios contienen la substancia liquénica, la menor concentración del antimetabolito induce una conducta de actividad enzimática semejante a la originada por la mayor concentración de actinomicina en ausencia de la droga.



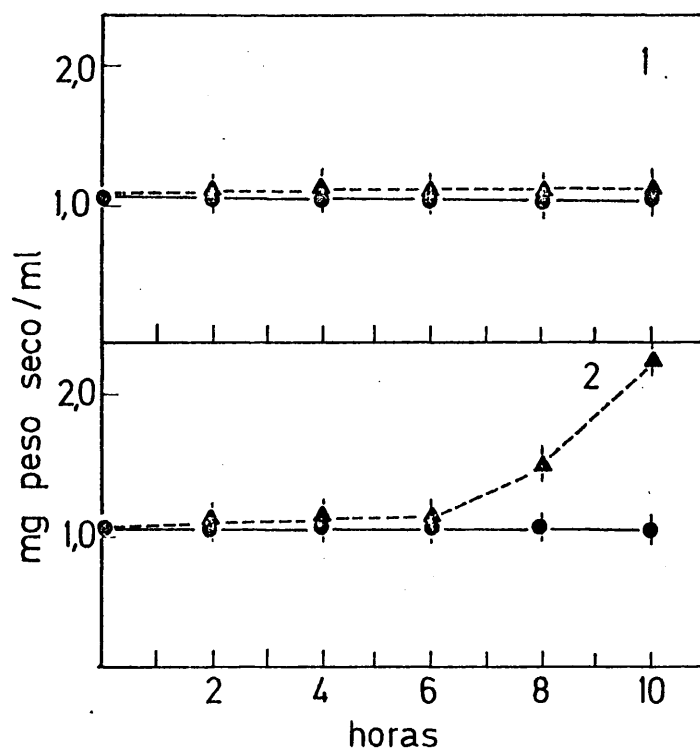


Figura 19. Crecimiento de *Proteus mirabilis* en medios suplementados con actinomicina D 50 μ M (●) o 100 μ M (▲) en (1) ausencia o (2) presencia de ácido L-úsnico.

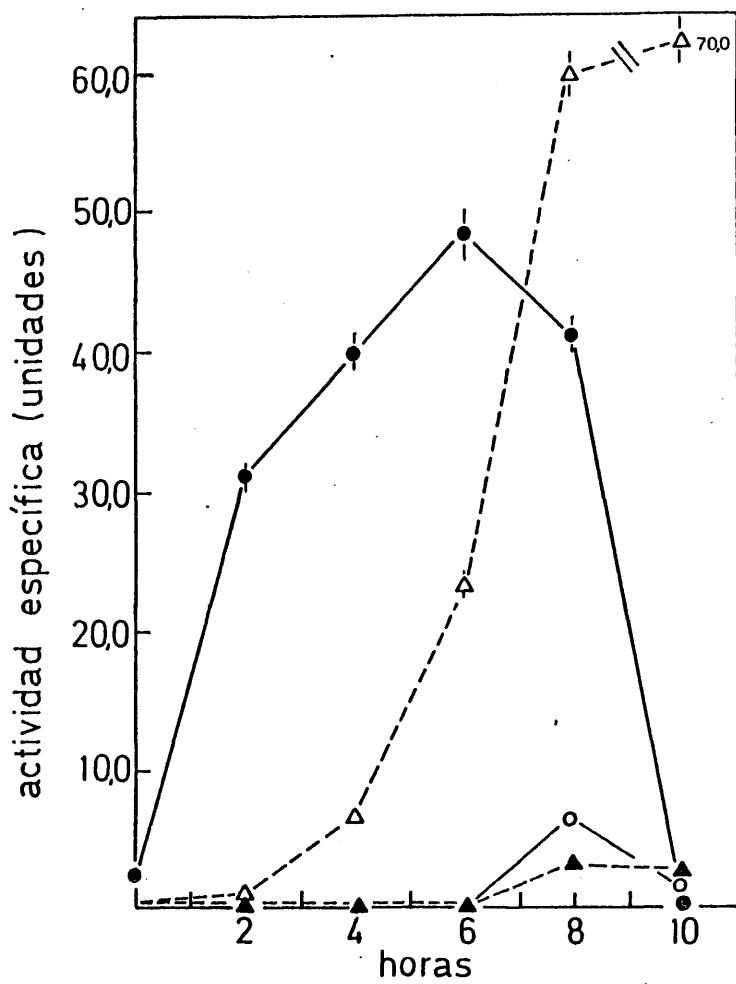


Figura 19. Actividad glucosamina-6P sintetasa en extractos de células sembradas en medios que contienen (○, △) o no (●, ▲) ácido L-úsico, adicionando en momento de la siembra actinomicina D 50 μ M (círculos) o 100 μ M (triángulos).

Por el contrario, la administración del antimetabolito a concentración 100 μ M en medios suplementados con ácido L-úsnico permite un notable aumento de los niveles de actividad enzimática desde las primeras horas, alcanzando un valor anormalmente alto al término del tiempo de experimentación.

En lo referente a la actividad enzimática encontrada en el medio de cultivo, en todos los casos se detecta un incremento en dicha actividad durante las primeras horas, por adición de actinomicina D, decreciendo a continuación aunque sin llegar a anularse en ningún caso (figura 20). La única excepción la constituyen los resultados observados cuando se suplementa un medio normal, sin úsnico, con actinomicina D 100 μ M, que origina un aumento continuado de actividad durante todo el tiempo considerado. El máximo valor de actividad encontrado se alcanza a las seis horas, cuando la adición del antimetabolito se realiza a la mayor concentración de las ensayadas en medios suplementados con la sustancia líquénica.

3.8. Efecto del cloranfenicol sobre el crecimiento de Proteus mirabilis y la actividad glucosamin-6-P sintetasa.

El efecto de la inhibición de la traducción fue estudiado por adición a los medios de cultivo, a tiempo cero, de cloranfenicol a varias concentraciones, tanto en ausencia como en presencia de ácido L-úsnico.

El crecimiento, estimado como variación del peso seco de los cultivos, se representa en la figura 21. Añadiendo cloranfenicol sobre medio normal, se produce una larga fase de latencia de la que no sale el cultivo hasta las últimas horas de experimentación, siendo este comportamiento similar para las tres concen-

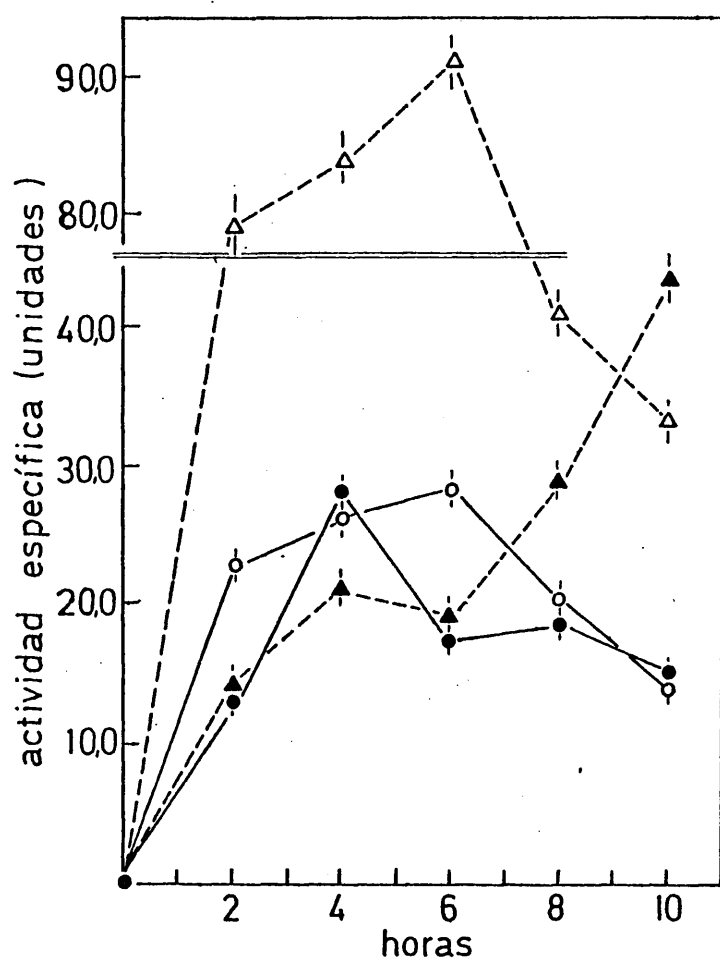


Figura 20. Actividad glucosamina-6-P sintetasa encontrada en los medios al cultivar células en presencia de actinomicina D. Los símbolos tienen el mismo significado que en la figura 19.

traciones utilizadas (10, 30 y 100 $\mu\text{g/ml}$) (ver figura 21.1.). En presencia de ácido L-úsnico, las mayores concentraciones del antimetabolito producen una inhibición total del crecimiento a lo largo de todo el tiempo de experimentación. Por el contrario, una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, después de una fase de detención que abarca las seis primeras horas de cultivo, permite incremento del peso seco, lográndose duplicar el peso inicial al término del tiempo utilizado (figura 21.2.).

Los niveles de actividad enzimática correspondientes a los extractos celulares se representan en la figura 22. La mayor actividad específica se detectó para la menor concentración utilizada del antimetabolito y a las ocho horas de cultivo. Una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ permite un pequeño incremento de la actividad en las dos primeras horas, disminuyendo a continuación para volver a recuperarse al término del tiempo de experimentación. Por el contrario, la mayor concentración utilizada provoca en las dos primeras horas un aumento en la actividad enzimática superior al logrado con las otras concentraciones ensayadas, actividad que es anulada a las dos horas siguientes (figura 22.1.).

Cuando el cloranfenicol fue suministrado a medios que contenían ácido L-úsnico (figura 22.2.), la menor concentración utilizada permite un ligero incremento en la actividad enzimática durante las primeras horas de cultivo, incremento que es notablemente acelerado en las dos últimas horas. Aumentando la concentración del inhibidor, el efecto se ve drásticamente invertido. Una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ mantiene los valores de actividad similares al inicial durante todo el tiempo de experimentación, y una concentración superior, 100 $\mu\text{g/ml}$, anula la actividad enzimática, observándose solo una pequeña recuperación al final del tiempo utilizado.

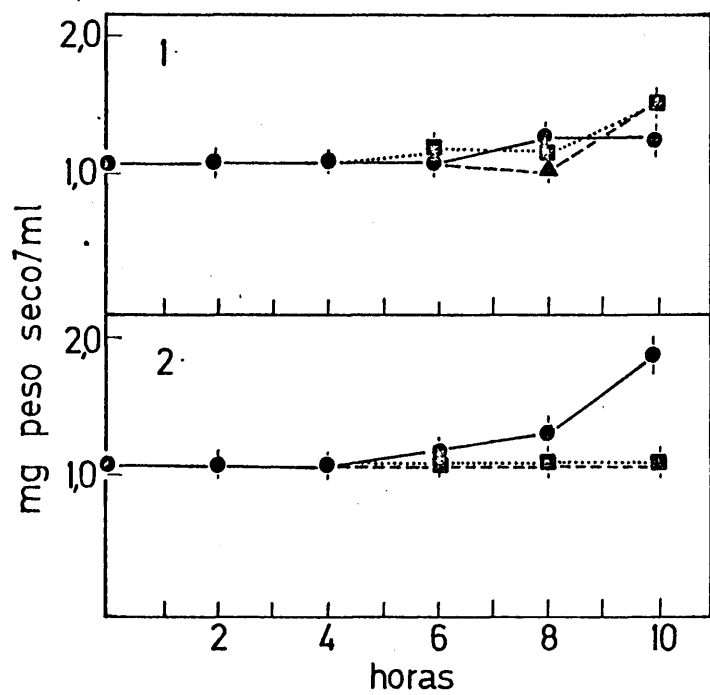


Figura 21. Variación de peso seco de cultivos de *Proteus mirabilis* en medios suplementados con cloranfenicol a concentración de 10 (●), 30 (▲) y 100 µg/ml. 1. En ausencia de ácido L-úsnico; 2. en presencia de ácido L-úsnico.

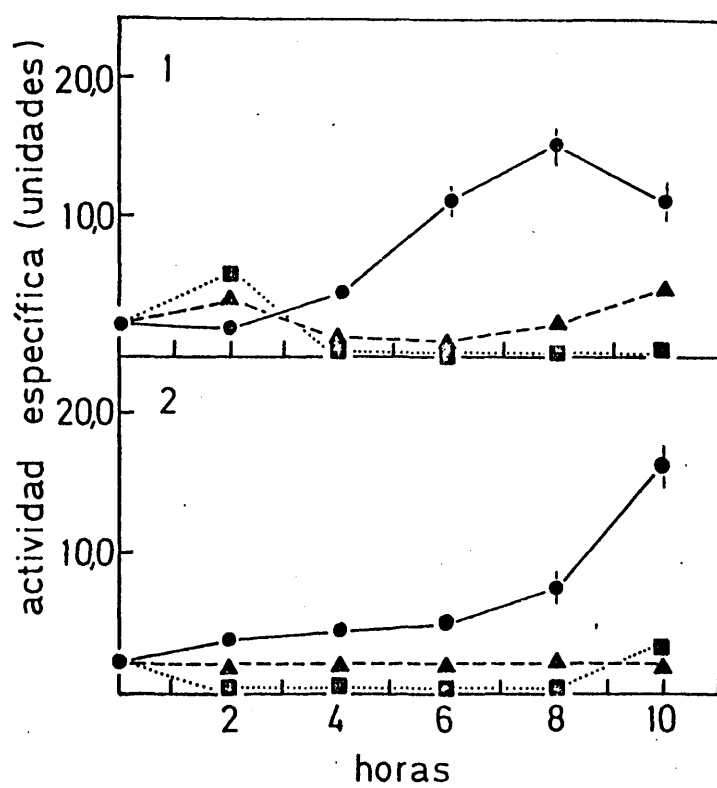


Figura 22. Actividad glucosamina-6-P sintetasa en extractos acelulares de *Proteus mirabilis* sembrado en ausencia (1) o presencia (2) de ácido L-ús-nico. La significación de los símbolos es la usada en la figura 21.

Los resultados obtenidos al estimar la actividad enzimática en los medios de cultivo se exponen en la figura 23. Cuando las células son sembradas en medios no suplementados con ácido L-úsnico, no se detecta actividad enzimática vertida al medio cuando éste contiene cloranfenicol en la menor concentración utilizada, aumentando con la concentración del antimetabolito (figura 23.1.). Los mismos resultados se obtienen para medios suplementados con la sustancia liquénica (figura 23.2.) en tanto en cuanto se refiere a la dependencia de actividad encontrada en el medio respecto a la concentración utilizada de antibiótico, salvo que, en este caso, los medios conteniendo la menor concentración posible de cloranfenicol muestra una discreta actividad enzimática, y que la actividad recuperada en medios que contienen antimetabolito a una concentración de 100 µg/ml es más del doble de la encontrada en ausencia del ácido L-úsnico.

3.9. Purificación y propiedades de la glucosamina-6-P sintetasa.-

El enzima responsable de la síntesis de glucosamina-6-P fue purificado, partiendo de 7,0 g en peso seco de células recogidas al inicio de la fase exponencial de crecimiento, siguiendo el protocolo detallado en materiales y métodos. En cada uno de los pasos seguidos se valoró la actividad específica como criterio de purificación.

El extracto libre de células fue tratado con sulfato de polimixina, consiguiendo la precipitación de los ácidos nucleicos y una recuperación de actividad del 98%. El sobrenadante de esta precipitación fue adsorbido en gel de fosfato cálcico, extrayendo el enzima con tampón fosfato (figura 24), correspondiendo la máxima actividad a una concentración 50 mM del eluyente

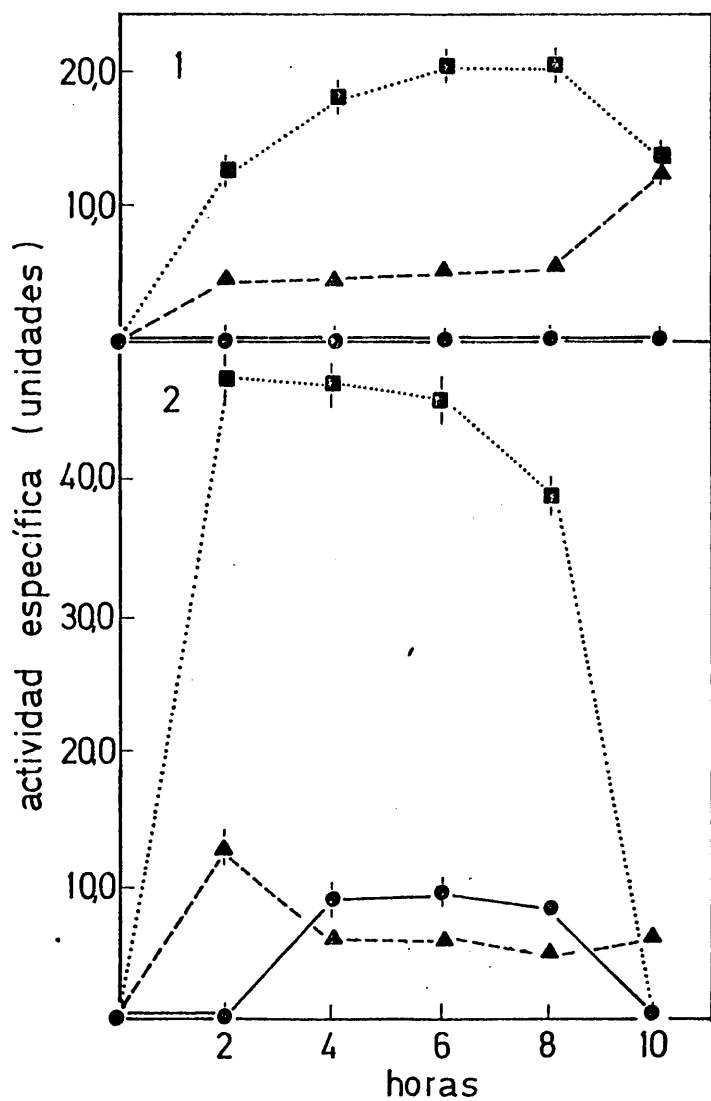


Figura 23. Actividad glucosamina-6-F sintetasa en medios de crecimiento sin (1) o con (2) ácido L-úsico añadido.

y una recuperación de actividad del 43%. Esta fracción fue cargada sobre una columna de DEAE-celulosa, eluyendo con tampón fosfato que contenía concentraciones crecientes de ClNa (figura 25), lográndose una fracción, que eluía para una concentración de ClNa 150 mM, que contenía la mayor actividad específica. La recuperación de actividad representaba casi un 43% y el enzima aparecía purificado alrededor de 113 veces. Un resumen de esta purificación se detalla en la tabla IV.

3.9.1. Temperatura y pH óptimos. La estimación de la temperatura óptima para la actividad enzimática se realizó en mezclas de incubación que contenían 120 μ g del enzima purificado. Los resultados se expresan en la figura 26. El enzima aparece como termoestable ya que la actividad enzimática, aunque disminuida, no se anula a 90°, presentando el óptimo de actividad a 37°.

El pH óptimo se estimó utilizando la misma cantidad de proteína en las mezclas de reacción, para una gama de pH desde 5,5 a 9,0 utilizando para ello tampones Tris-maleato, fosfato y borato-ácido bórico. La temperatura de medida fue de 37°. En la figura 27 puede observarse un incremento en la velocidad de reacción paralelo al aumento de pH para el tampón Tris-maleato. El máximo se logra para pH 7,5 utilizando tampón fosfato, aunque aparece un máximo secundario a pH 8,5 para tampón borato-ácido bórico. Se estima, pues, en 7,5 el pH óptimo para el enzima.

3.9.2. Cinética enzimática y efecto del ácido L-úsnico. El estudio de las constantes cinéticas del enzima se estimó en función de los dos sustratos de la reacción, glutamina y fructosa-6-P, en presencia o ausencia de 28 μ g de ácido L-úsnico, representando velocidad de reacción frente a concentración de sustrato y sus recíprocos.

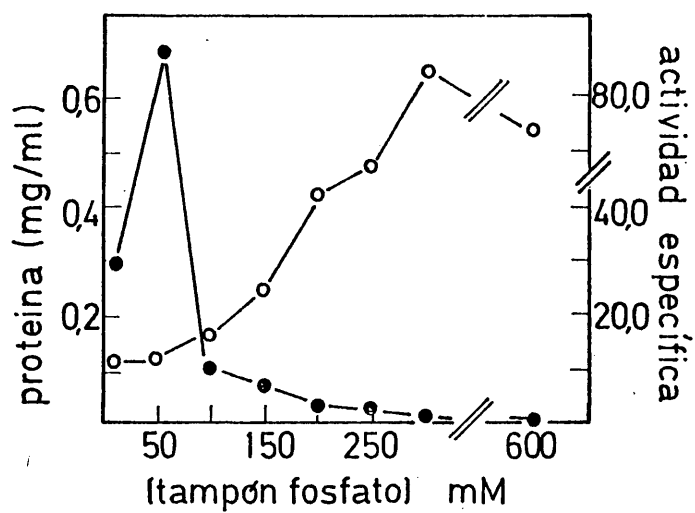


Figura 24. Diagrama de elución de glucosamina-6-P sintetasa a partir de gel de fosfato cálcico mediante molaridades crecientes de tampón fosfato. (●) actividad específica; (o) cantidad de proteína.

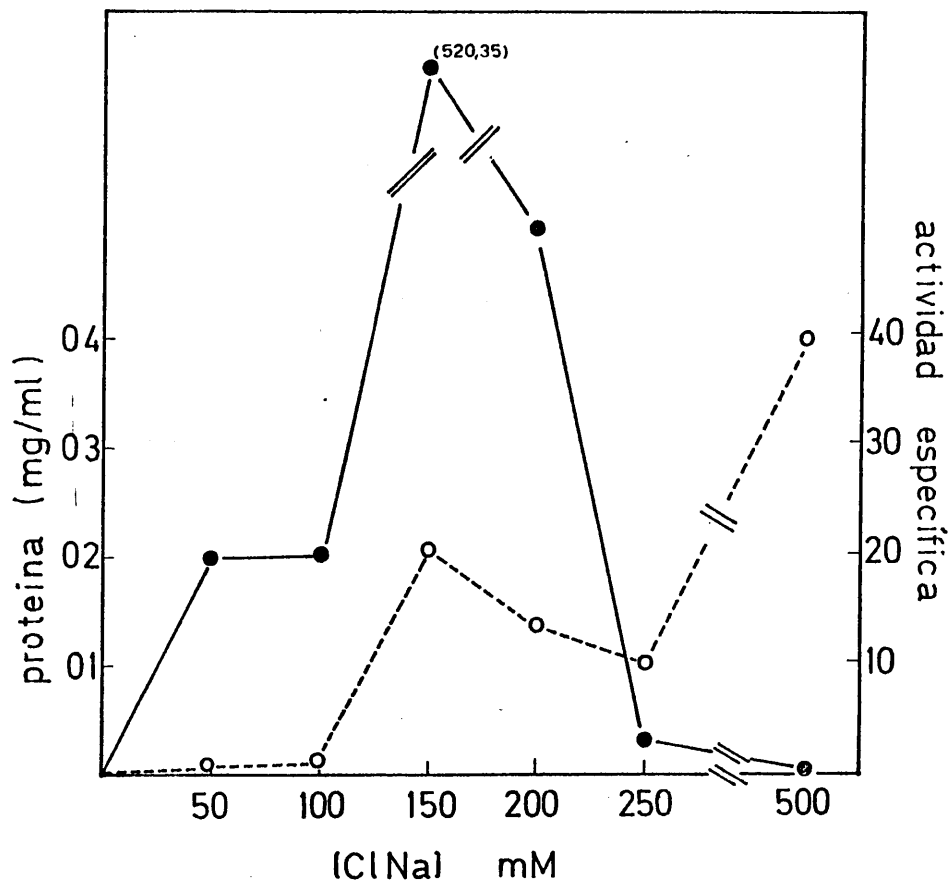


Figura 25. Diagrama de elución de glucosamina-6-P sintetasa de una columna de DEAE-celulosa mediante molaridades crecientes de ClNa. (●) actividad específica; (○) cantidad de proteína.

TABLA IV. Purificación de glucosamina-6-P sintetasa.

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína (mg)	Actividad específica (unidades)	Actividad Total (unidades)	Recupe- ración	Purifi- cación
Extracto libre de células	50	5,53	276,5	4,61	1274,66	100	--
Sobrenadante polimixina	50	5,01	250,5	4,98	1247,49	97,86	1,08
Eluato gel de fosfato cálcico	50	0,13	6,5	85,40	555,10	43,54	18,52
Eluato DEAE- celulosa	5	0,21	1,05	520,35	546,36	42,86	112,87

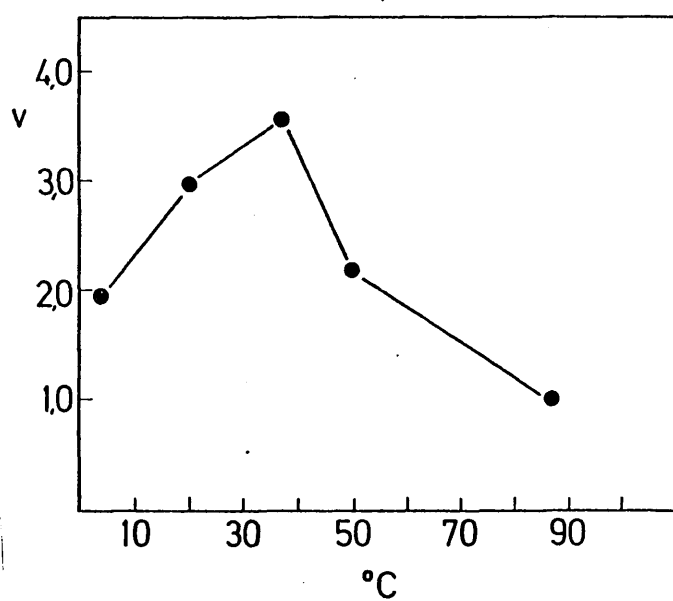


Figura 26. Determinación de la temperatura óptima para la actividad glucosamina-6-P sintetasa.

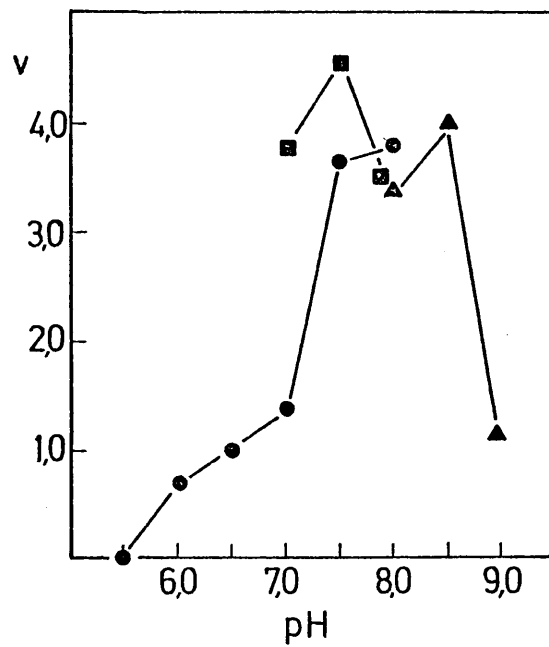


Figura 27. Determinación del pH óptimo para el enzima.
(●) tampón Tris-maleato; (■) fosfato; (▲)
borato-ácido bórico.

Las cinéticas del enzima en función de la concentración del substrato donador del grupo amino, se representan en la figura 28. En todos los casos, la concentración de fructosa-6-P utilizada fue de 40 μ moles en 2,0 ml de volumen final de mezcla de reacción. Puede observarse una cinética típica de un enzima micaeliano, presentando una velocidad máxima de 2,0 y una K_m de 18,18 mM para la L-glutamina. La presencia de ácido L-úsnico no modifica esta velocidad máxima aunque aparece una leve inhibición de tipo competitivo, estimándose el valor de la K_i en 0,16 mM.

Las cinéticas del enzima en función de la concentración de fructosa-6-P se analizaron fijando la concentración de L-glutamina en 30 μ moles en los 2,0 ml de mezcla de reacción. Los resultados se expresan en la figura 29. Igual que en el caso anterior, puede observarse un comportamiento micaeliano típico, con una velocidad máxima estimada en 0,95 y una K_m de 13,3 mM, lo que nos indicaría una ligeramente mayor afinidad del enzima por la fructosa-6-P que por la L-glutamina. La presencia de la substancia líquénica en las mezclas de reacción provoca una patente activación, estimándose un aumento en la velocidad máxima desde 0,95 a 1,82.

3.9.3. Determinación del peso molecular. El peso molecular del enzima fue estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida, en placa, y en gradiente lineal de poliacrilamida, utilizando como patrones proteínas de peso molecular conocido: ureasa (480.000), catalasa (235.000), alcohol deshidrogenasa (148.000), seroalbúmina bovina (65.000), ovoalbúmina (43.000) y pepsina (35.000).

Como se observa en la figura 30, el enzima presenta una movilidad relativa de 0,45, lo que correspondería a un peso molecular aproximado de 100.000. El enzima incubado con ácido L-úsnico presenta una movilidad

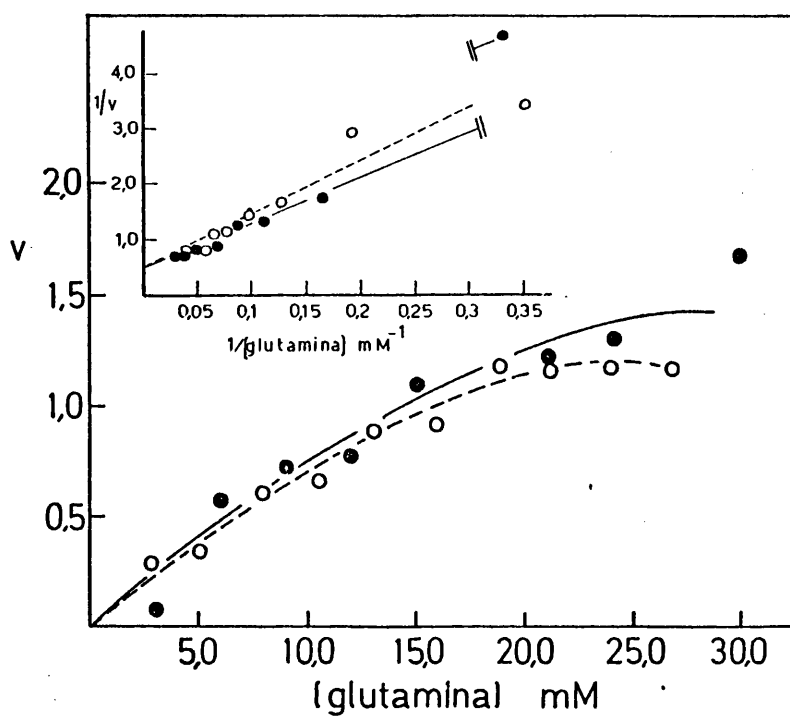


Figura 28. Dependencia de la velocidad de reacción sobre la concentración de L-glutamina para una concentración fija de fructosa-6-P y rectas recíprocas correspondientes incluyendo (o) o sin incluir (●) ácido L-úsnico en las mezclas de reacción.

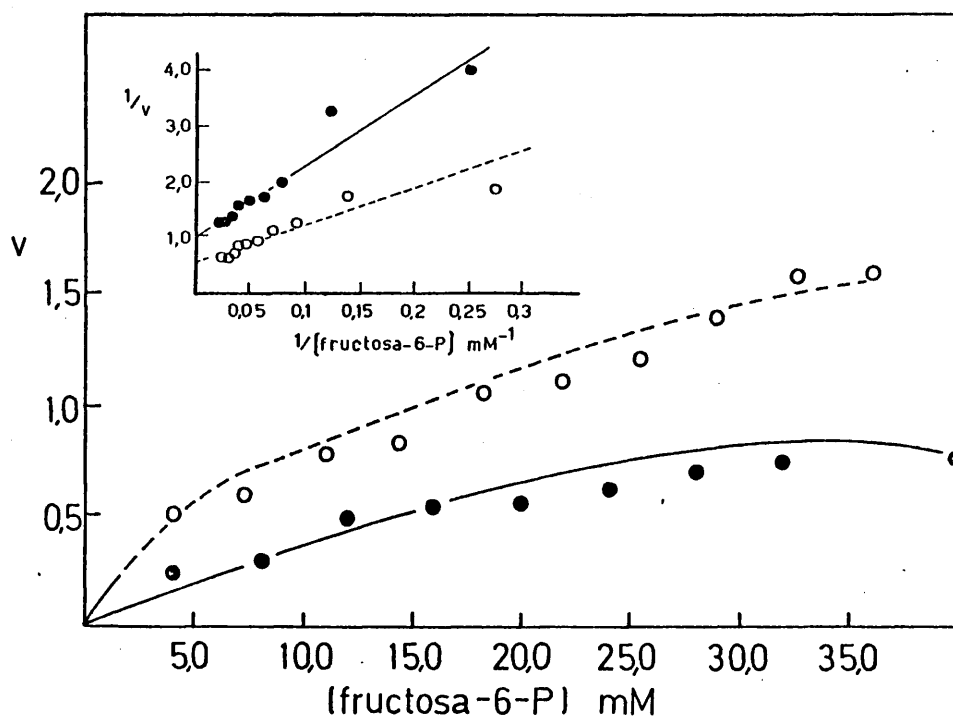


Figura 29. Efecto de la variación de la concentración de fructosa-6-P sobre la velocidad de reacción para una concentración fija de L-glutamína, y rectas recíprocas correspondientes.

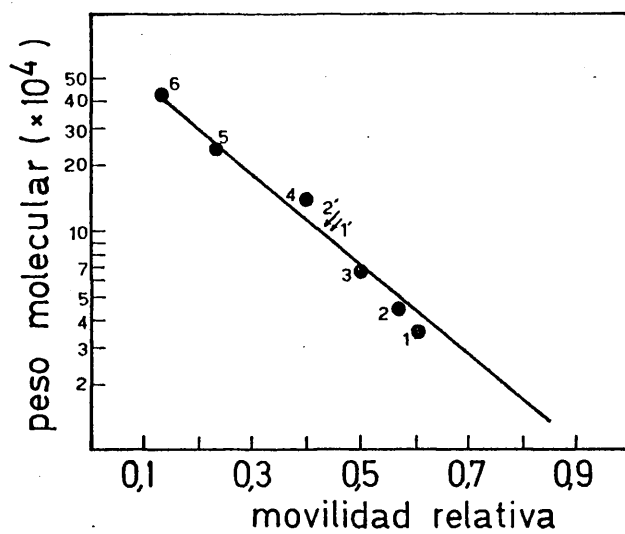


Figura 30. Determinación del peso molecular de la glucosamina-6P sintetasa en función de su movilidad electroforética en gradiente lineal de poliacrilamida. 1. Pepsina, 2, ovoalbúmina, 3, seroalbúmina bovina, 4, alcohol deshidrogenasa, 5, catalasa, 6, ureasa, 1', glucosamina-6-P sintetasa, 2' enzima tratado con ácido L-úsnico.

de 0,43, lo que representaría un peso molecular aproximado de 105.000.

La electroforesis realizada en presencia de dodecilsulfato sódico, utilizando tripsina además de catalasa entre las proteínas patrones, se representa en la figura 31. En este caso, por acción del SDS, las proteínas poliméricas aparecen divididas en sus subunidades constituyentes. La glucosamina-6-P sintetasa, en estas condiciones, revela su constitución en cuatro unidades distintas de movilidades relativas 0,77, 0,785, 0,82 y 0,83, que corresponderían a pesos moleculares aproximados de 38.000, 35.000, 26.000 y 24.000 respectivamente, lo que daría un peso molecular para la proteína polimérica estimado en 123.000.

3.9.4. Espectros característicos. El espectro de absorción de la proteína purificada, realizado en las condiciones especificadas en materiales y métodos, abarcó un barrido desde 230 a 330 nm. Este espectro muestra un espectro característico de proteína purificada con un máximo de absorción a 272 nm (figura 32).

Los espectros de fluorescencia se realizaron, para el enzima purificado, a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y para el enzima tratado con ácido L-úsnico, en una proporción de 800 μg de proteína y 84 μg de sustancia líquénica, dializando la mezcla frente a ClNa al 2,5% durante 12 horas a 4° antes de la medida del espectro.

El espectro de emisión del enzima puro, excitando a una longitud de onda fija de 272 nm, abarcó un barrido de emisión desde 290 a 400 nm, obteniéndose el máximo característico de triptófanos a 330 nm. Siendo este máximo muy amplio, enmascaraba el típico de las tiro-

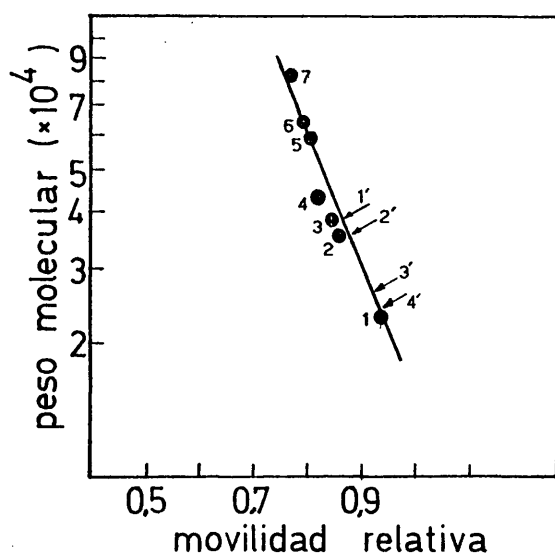


Figura 31. Determinación del peso molecular de subunidades de glucosamina-6-P sintetasa, disociada con SDS, por electroforesis en gradiente de poliacrilamida. 1, tripsina, 2, pepsina, 3, alcohol deshidrogenasa, 4 ovoalbúmina, 5, catalasa, 6 seroalbúmina bovina, 7, ureasa, 1', subunidad 38.000, 2', subunidad 35.000, 3', subunidad 26.000, 4', 24.000.

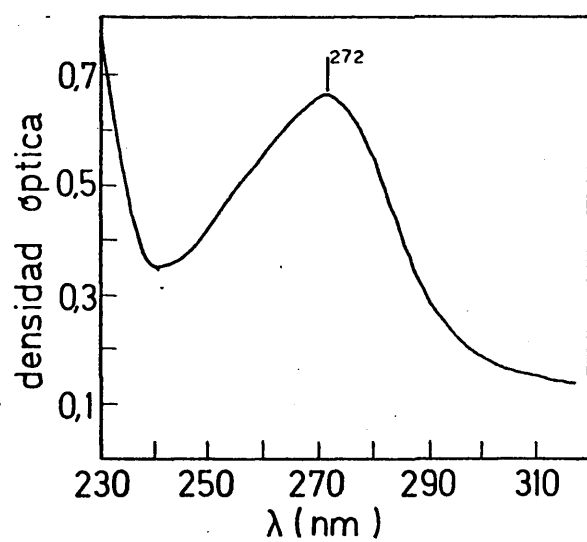


Figura 32. Espectro de absorción de la glucosamina-6-P sintetasa purificada.

xinas a 305 nm (figura 33).

El espectro de emisión del enzima tratado con la substancia liquénica fue realizado en idénticas condiciones y presenta una gran semejanza con el obtenido para el enzima no tratado (figura 34).

Los espectros de excitación se realizaron manteniendo fija la longitud de onda de emisión a 305 nm para las tiroxinas y a 330 nm para los triptófanos. Los espectros correspondientes al enzima purificado se muestran en la figura 35, siendo más amplio, como era de esperar, el espectro correspondiente a los triptófanos, lo cual corroboraría el enmascaramiento de las tiroxinas observado en el espectro de emisión. Los espectros obtenidos para el enzima tratado con el ácido L-úsico (figura 36) no presentan alteraciones notables

3.9.5. Cinéticas de unión enzima-ligando. La valoración de la unión del ácido L-úsico a la proteína se realizó utilizando 250 µg de enzima purificado y concentraciones variables de ligando, entre 0,62 y 24,8 µg.

Las cantidades de ligando unido al enzima se representan, bien directamente frente a cantidad de ácido L-úsico total, bien según la representación de SCATCHARD.

La representación directa (figura 37) corresponde a la rama de una hipérbola, presentando una subida inicial muy pronunciada para las menores concentraciones de ligando total, y atenuándose para concentraciones de ligando superiores a 4,0 µg.

En la representación de SCATCHARD se observa un brusco descenso inicial que se correspondería con la existencia de centros en el enzima de alta afinidad para el ligando, seguido de un descenso mucho más atenuado, corres-

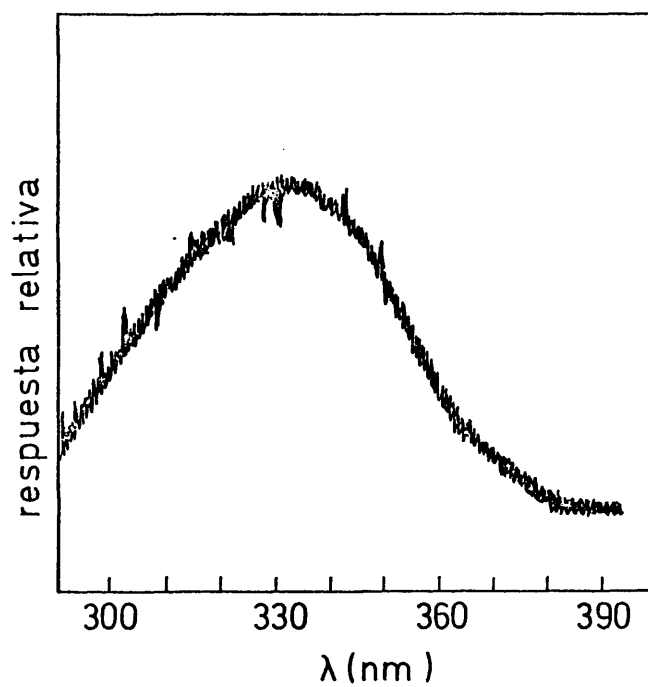


Figura 33. Espectro de emisión de fluorescencia del enzima glucosamina-6-P sintetasa, excitado a una λ fija de 272 nm.

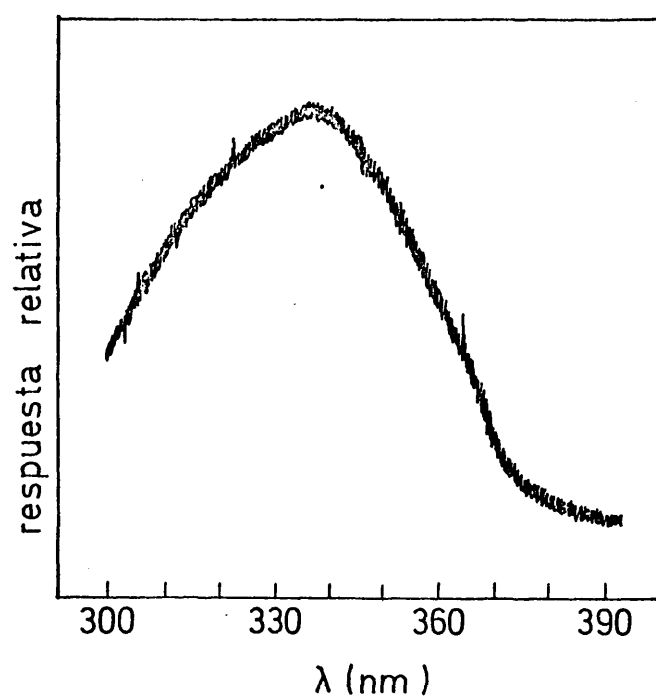


Figura 34. Espectro de emisión de fluorescencia del enzima tratado con ácido L-úsico.

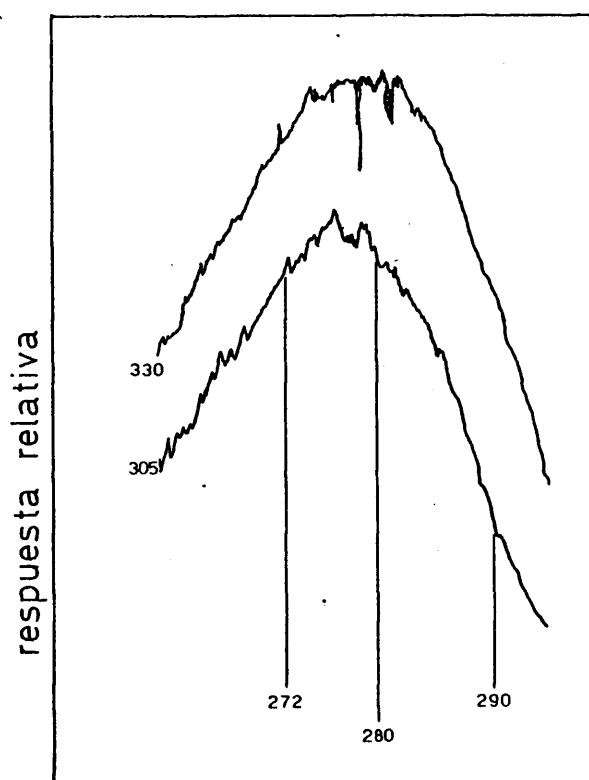


Figura 35. Espectros de excitación de fluorescencia del enzima emitiendo a una λ fija de 330 nm (superior) o 305 nm (inferior). El eje de abscisas se hace coincidir con la línea base.

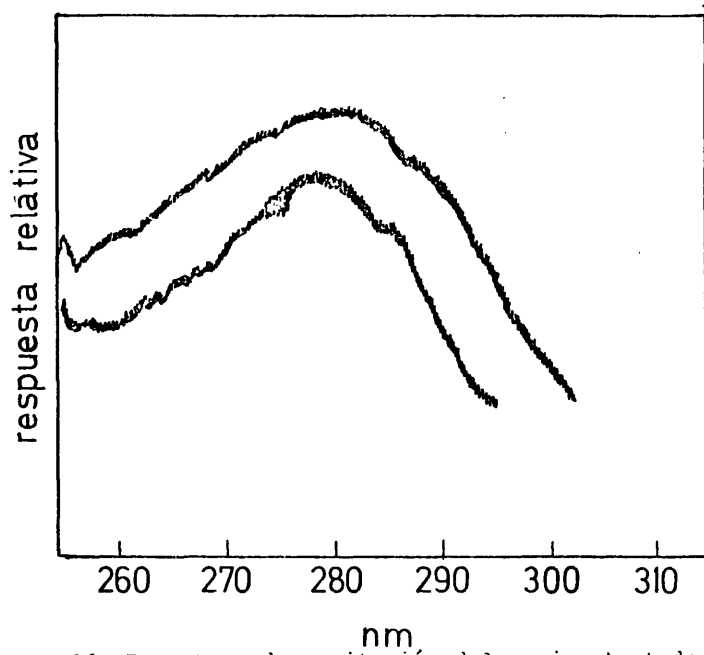


Figura 36. Espectros de excitación del enzima tratado con ácido L-úsico.

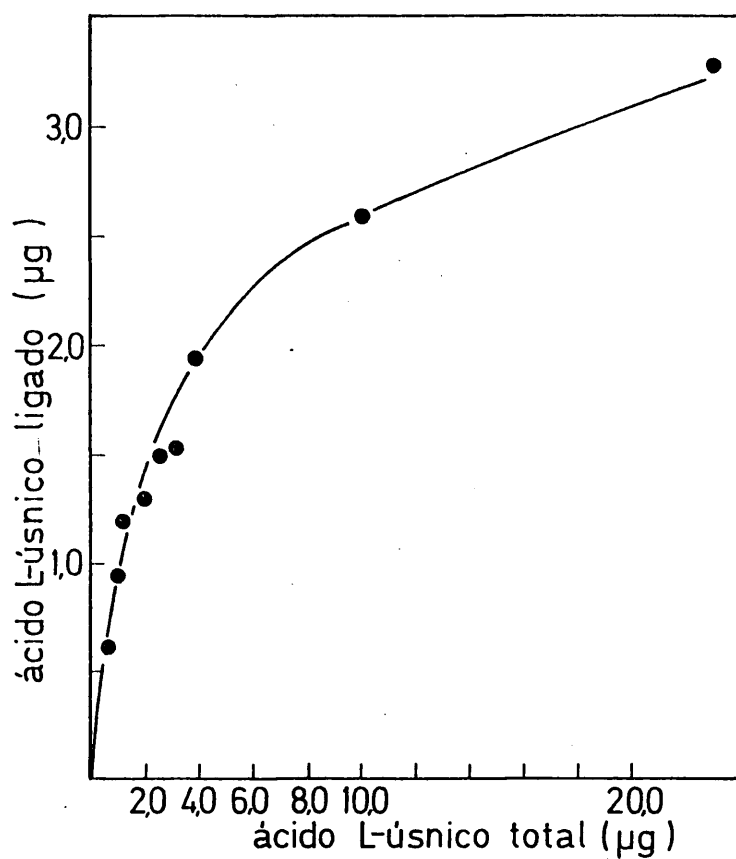


Figura 37. Representación directa de la cinética de unión del ácido Lúsnico al enzima.

pondiente a un segundo tipo de centros de unión de baja afinidad por el ligando (figura 38).

3.9.6. Naturaleza de la unión. El espectro diferencial en la zona del ultravioleta entre la glucosamina-6-P sintetasá purificada y la misma tratada con ácido L-úsico se presenta en la figura 39. En la misma figura se representa el espectro diferencial entre el ácido L-úsico y el correspondiente al mismo, protonado en un medio ácido. Como puede observarse hay una notable semejanza entre ambos espectros diferenciales, lo que podría sugerir que el ácido L-úsico puede ser protonado en el curso del su unión con el enzima.

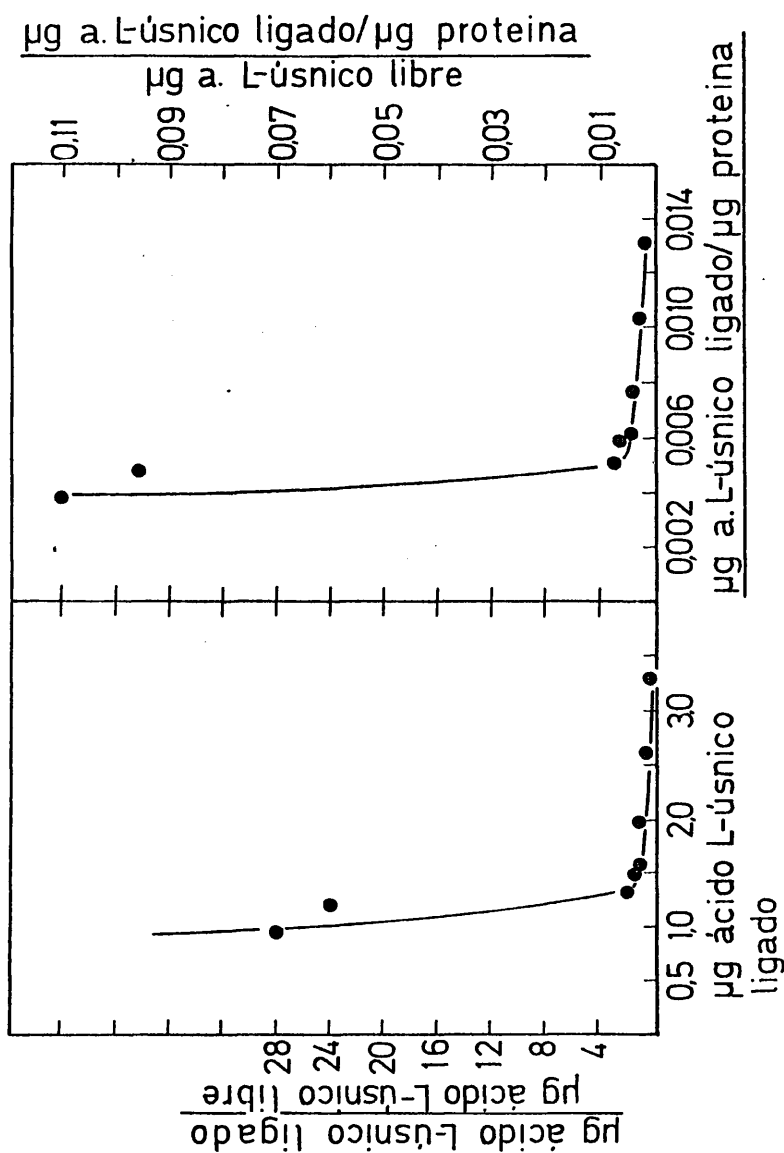


Figura 38. Representación de SCATCHARD, correspondiente a la representación directa mostrada en la figura 37.

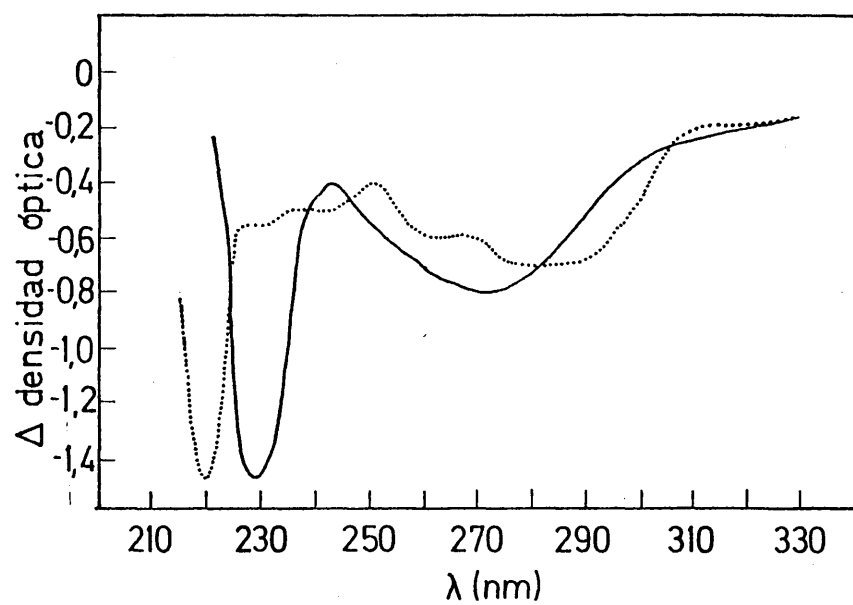


Figura 39. Espectros diferenciales en la zona del ultravioleta del enzima ligado-enzima (línea continua) y ácido L-úsico protonado-ácido L-úsico (línea de puntos).

86

27
•
•

4. DISCUSSION

El grado de oxidación de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos ha sido utilizado como característica de permeabilidad en Pseudomonas sp. (KOGUT y PODOSKI, 1953; BARRET y KALLIO, 1953) y en Pseudomonas aeruginosa (CLARKE y MEADOW, 1959), considerando que los enzimas oxidativos del ciclo de KREBS son proteínas constitutivas. Por tanto, los niveles variables de oxidación de un solo metabolito por células cultivadas sobre diferentes fuentes de carbono dependen de la permeasa inducida. Pero esta suposición resulta insostenible para Proteus mirabilis sin una base experimental suficiente.

En este sentido, se sabe que los niveles de varias deshidrogenasas pueden ser modificados por represión catabólica (TAKAHASHI, 1975) o por inactivación en Escherichia coli, o por consumo de la fuente de carbono (LEWIS y MILLER, 1975) en Desulfovibrio. También han sido observadas alteraciones en las deshidrogenasas en mitocondrias de levadura en crecimiento y en fase de reposo (UTTER et al., 1968).

Sin embargo, como puede observarse en la tabla II, los cambios mostrados en los niveles de actividades succínico, málico e isocítrico deshidrogenasa no explican el incremento en el consumo de oxígeno por oxidación de fumarato por aquellos organismos que han sido cultivados en presencia de L-usnato. Las células que han crecido en medios suplementados con L-usnato a 14,0 µg/ml y fumarato, oxidan este metabolito a un nivel 30 veces superior al desarrollado por bacterias cultivadas en ausencia de la sustancia liquénica (Tabla I). Cuando las células no tienen permeasa inducida (o no han sido puestas en condiciones de inducir permeasa), la oxidación del fumarato solo puede ser llevada a cabo por organismos que han crecido en presencia de L-usnato, alcanzando niveles de oxidación semejantes a los obtenidos para las células que tienen

la permeasa inducida.

Por tanto, hemos de rechazar la hipotética acción de la substancia liquénica sobre los niveles de permeasa.

Por otra parte, la formación de ATP y el consumo de oxígeno no se ven modificados en vesículas de membrana obtenidas de células cultivadas en medios suplementados con L-usnato (tabla III). El incremento en el consumo de oxígeno no puede ser explicado, por tanto, por acción de una baja concentración del fenol sobre el proceso de la fosforilación oxidativa, tal y como ha sido descrito para el dinitrofenol (LOOMIS y LIPMANN, 1948), y confirmado posteriormente para más altas concentraciones de ácido L-úsico que las utilizadas en el presente trabajo JOHNSON et al., 1950).

Las alteraciones en la continuidad de la membrana, producidas por la substancia liquénica, pueden ser la base de los cambios observados en la permeabilidad. Es bastante improbable que células presentando grandes rupturas en la membrana plasmática, como demuestran las micrografías, puedan ser viables. Estas disrupciones pueden ser interpretadas como el estado final en el proceso de degradación de la estructura, siendo los estados intermedios responsables del acelerado consumo de fumarato. Por otra parte, el engrosamiento detectado en la pared bacteriana no puede ser explicado por secciones tangenciales de las células, sino por un ensanchamiento de la estructura, dado que todas las células visualizadas lo presentan.

Si se acepta este engrosamiento como base de la estabilidad física de células con membranas alteradas, se deben investigar los mecanismos enzimáticos que propician estos depósitos adicionales de materiales de pared. El presente trabajo se ha limitado al análisis de la actividad enzimática responsable de la síntesis de glucosamina-6-P, dado su papel iniciador en la ruta biosintética de los componentes de las cadenas base del peptidoglicano, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico (DAVISON et al., 1957), así como de la biosín-

tesis de distintos aminoazúcares (PHELPS et al., 1970), sin olvidar la integración de la glucosamina en los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa (LUDERITZ et al., 1974).

Las células cultivadas en medios suplementados con glucosa y sulfato amónico presentan un incremento en la actividad enzimática, así como en la excretada al medio de cultivo, actividad que es preferentemente retenida por las células cuando éstas crecen en presencia de ácido L-úsico. Esta retención podría ser interpretada como dirigida al engrosamiento de la pared celular.

Cuando el sulfato amónico es substituido por L-glutamina en los medios de cultivo, la actividad enzimática es anulada en el interior de las células y al mismo tiempo se favorece su excreción al medio. Estos datos son coincidentes con la falta de crecimiento activo en la población bacteriana, dado que la ausencia de una actividad enzimática endocelular no permitiría la suficiente síntesis de hexosamina para sustentar el crecimiento de las paredes celulares. Sobre la base de estos resultados podría pensarse que la L-glutamina no permeara al interior de las células, hipótesis que, aunque no ha podido ser investigada, no cuenta con antecedentes bibliográficos (ESPIN et al., 1979). En estas condiciones, la excreción detectada de actividad a los medios de cultivo, se ve cortada cuando se añade el fenol al medio, observándose, consecuentemente, un aumento notable en la actividad enzimática correspondiente a los extractos acelulares. Este aumento debe ser considerado como retención del enzima, dado que la substancia líquénica no parece afectar la síntesis de la proteína. Todos estos datos confirmarían, de nuevo, la modificación de la permeabilidad de membrana por el ácido L-úsico.

Utilizando inhibidores de la síntesis de ARN, como es la actinomicina D, se observa una drástica inhi-

bición del crecimiento, correspondiéndose con el descenso en los niveles de actividad glucosamina-6-P sintetasa celulares en función de la concentración empleada del antimetabolito, actividad que es mantenida para el enzima excretado al medio. Podría pensarse que nos encontramos ante dos formas distintas de enzima, una de ellas, la excretable, no inhibida en su síntesis por actinomicina y otra, acumulada en las células, afectada en su síntesis por el antimetabolito. Es conocido el paradójico efecto de la actinomicina D como inductor (?) de glucoquinasa en células hepáticas de rata (SOLS et al., 1965), así como de fosfatasas ácidas en Anacystis y Euglena (MUÑOZ et al., 1978), lo que, indiscutiblemente, complicaría la hipótesis emitida.

Cuando las células de Proteus mirabilis son cultivadas en presencia de actinomicina D y ácido L-úsnico, la inhibición del crecimiento, entendido como aumento en el peso seco de los cultivos, desaparece para la mayor concentración del antimetabolito, paralelamente al aumento de la actividad glucosamina-6-P sintetasa celular y, en parte, también correspondido con el incremento de la actividad encontrada en el medio de cultivo. Conocida es la acción de la actinomicina D como inhibidor de la transcripción en los procesos de síntesis proteica, inhibición que se realiza por formación de complejos con el ADN mediante puentes de hidrógeno con los residuos desoxiguanina del ácido nucleico (HAMILTON et al., 1963). Por otro lado conocemos la capacidad que presentan los fenoles del tipo del utilizado para unirse reversiblemente a las proteínas (LOOMIS y BATTLE, 1966), uniones que son relativamente fuertes cuando los puentes se establecen con amidas N-substituidas (LOOMIS, 1969). Sobre la base de estos datos podríamos presumir la formación de complejos entre el ácido L-úsnico y la actinomicina D en alta concentración mediante puentes de hidrógeno, de modo que se impidiese la acción inhibidora del antimetabolito y permitiendo de esta manera el funcionamiento de la ruta biosintética de proteínas y aumentando, por tanto, la actividad del enzima

estudiado.

Si el antimetabolito utilizado es un inhibidor de la síntesis proteica a nivel de traducción, como sería el caso del cloranfenicol, se observa una anulación del crecimiento de la población bacteriana paralela a la pérdida de la actividad enzimática celular, disminución que se ve acelerada conforme al aumento de la concentración del inhibidor. Este comportamiento coincide con el encontrado para el enzima purificado de hígado de rata en presencia de cloranfenicol (AKAMATSU y MAEDA, 1971). El aporte de ácido L-úsnico a los medios de cultivo suplementados con el antimetabolito no modifica el comportamiento encontrado en ausencia de la sustancia líquénica, apareciendo inhibición del crecimiento y disminución de la actividad glucosamina-6-P sintetasa en función del aumento de la concentración de cloranfenicol. En este caso, el ácido úsnico no parece interferir el papel del inhibidor de la síntesis proteica. Sin embargo, la sustancia líquénica parece propiciar el aumento de actividad en los medios proporcionalmente a la concentración del antimetabolito añadida. No encontraríamos, de nuevo, con la posibilidad de dos formas enzimáticas distintas, tal y como se ha discutido al analizar los resultados referentes a la utilización de la actinomicina D.

Al margen de que los cambios de actividad encontrados en células cultivadas en presencia de la sustancia líquénica puedan ser atribuidos a un proceso de retención ligado a los cambios de permeabilidad, no puede descartarse la hipótesis de una real unión del fenol con el enzima que pueda traducirse en un cambio de actividad. En efecto, los estudios realizados con el enzima purificado demuestran claramente que el ácido L-úsnico puede actuar como activador del enzima, al menos en cuando a la unión con la

fructosa-6-P se refiere, comportamiento atípico ya que el ácido L-úsnico siempre ha sido considerado como un inactivador de cierto número de enzimas. La explicación de este hecho debe buscarse en el modo de unión del fenol con la proteína.

Un enzima típicamente inactivado por el ácido L-úsnico es la ureasa, mediante un proceso de agregación de monómeros sobre el polímero base, de peso molecular 480.000, en el que están implicados los restos L-alanil y L-prolil del enzima (VICENTE et al., 1974). De esta manera pueden lograrse polímeros de hasta 860.000 de peso molecular (VICENTE et al., 1978). Aunque la insolubilización progresiva que sigue a este proceso de agregación es causa de inactivación, ésta se completa por la unión del fenol con grupos -SH del enzima ligados a su centro activo, proceso que es parcialmente impedido por la inclusión de L-cisteína en las mezclas de incubación (VICENTE y CIFUENTES, 1979). Sin embargo, esta protección no implica cambios en los grados de polimerización. Por tanto puede estimarse que la ureasa presenta dos tipos diferentes de puntos de unión para el ligando. Uno de ellos, modificado en su conducta de ligamiento por L-cisteína, se revela como de alta afinidad por el ligando y está relacionado con el centro activo; otro, de baja afinidad, está relacionado con el proceso de polimerización (GARCIA et al., 1980).

La representación de SCATCHARD para la cinética de unión del ligando a la glucosamina-6-P sintetasa también revela la existencia de dos tipos de centros de unión, por comparación a lo estudiado para otros sistemas enzimáticos (McDANIEL y KIRTLEY, 1974), presentando un tipo de centros de alta afinidad y otro de baja afinidad para el ligando (comparar con lo descrito por FOX y ERION, 1977). Pero, en este caso, en contraposición con lo descrito para la ureasa, la unión del ligando a la proteína no implica polimerización.

El peso molecular de la glucosamina-6-P sintetasa, estimado por electroforesis en gradiente lineal de poli-acrilamida, da un valor aproximado de 100.000, dato que concuerda con el peso molecular calculado por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa para el enzima purificado de E. coli y B. subtilis por KORNFIELD (1967), al que da un valor aproximado entre 90.000 y 107.000. Por tratamiento con SDS el enzima se revela como polimérico, detectándose cuatro subunidades de comportamiento electroforético distinto, cuyos pesos moleculares aproximados han sido calculados en 38.000, 35.000, 26.000 y 24.000.

Sin embargo, la electroforesis del enzima tratado con ácido L-úsnico revela un peso molecular de, aproximadamente 105.000, lo cual indica que la unión entre el enzima y el ligando no implica mayor grado de polimerización.

En contraposición con lo que sucede con otros ligandos, el ácido L-úsnico no muestra actividad de atrapador de fluorescencia del enzima, lo que puede inducirnos a descartar uniones del ligando con triptófano o tiroxina en la secuencia peptídica.

Sin embargo, los espectros diferenciales de absorción en la zona del ultravioleta parecen mucho más reveladores. La similitud del espectro diferencial obtenido para el enzima ligado y sin tratar con el espectro diferencial obtenido para el ácido L-úsnico protonado o no indican que el ligando puede protonarse al unirse al enzima a pH 7,5. Un análisis semejante ha sido realizado por MATTHEWS et al. (1977) para la dihidrofolato reductasa de E. coli con metotrexato y para el mismo enzima de L. casei (ROBERTS, 1978). La naturaleza de esta unión también difiere fundamentalmente de la descrita anteriormente para la ureasa.

5. CONCLUSIONES

- 1ª La adición de L-usnato a medios que contienen acetato, fumarato o citrato como fuente de carbono acelera el crecimiento de cultivos de Proteus mirabilis.
- 2ª Células crecidas sobre fumarato oxidan eficientemente este metabolito, pero no aquellas que han crecido sobre acetato o citrato. Este hecho se interpreta como dependiente de la síntesis de una permeasa específica.
- 3ª El fumarato es, sin embargo, eficientemente oxidado cuando las células han crecido sobre L-usnato, independientemente de la fuente de carbono existente en el medio.
- 4ª Esta oxidación no puede ser explicada por una acción del L-usnato sobre las deshidrogenasas del ciclo de KREBS, ya que la variación observada en tres de ellas, isocítrico, málico y succínico deshidrogenasa, no justifican un incremento tan notable en la capacidad de las células para consumir oxígeno.
- 5ª La fosforilación oxidativa no es afectada por la droga, a las concentraciones utilizadas, estimando aquella en vesículas aisladas de membrana.
- 6ª Tampoco puede explicarse por una acción directa del L-usnato sobre los niveles de permeasa inducida.
- 7ª El cultivo de Proteus mirabilis sobre L-usnato lleva consigo un aumento en la resistencia de las células a lisis osmótica.

- 8ª Esta resistencia puede explicarse por un notable engrosamiento de la pared celular en aquellas células que han crecido sobre L-usnato.
- 9ª El aumento en la velocidad de permeación del fumarato puede explicarse por la aparición de disrupciones en la membrana plasmática que coinciden en el espacio con las zonas engrosadas de la pared.
- 10ª La inclusión de ácido L-úsico en medios que contienen glucosa y sulfato amónico incrementa débilmente la actividad glucosamina-6-P sintetasa en células que han sido cultivadas en dichos medios, al mismo tiempo que disminuye notablemente la actividad recuperada en el medio, considerándose tal como enzima excretado.
- 11ª La presencia de glutamina, como fuente de nitrógeno substitutiva del sulfato amónico, en los medios de cultivo anula dicha actividad enzimática en células, aumentando considerablemente los niveles de enzima excretado. Esta situación es corregida por el fenol, que provoca la máxima retención del enzima en las células y la mínima excreción al medio externo.
- 12ª La actinomicina D rebaja drásticamente los niveles de actividad encontrados en las células, aunque no detiene su excreción. El ácido L-úsico es capaz de revertir los efectos de las mayores concentraciones de actinomicina D en cuanto a actividad endógena se refiere.
- 13ª El cloranfenicol anula la actividad enzimática celular y rebaja notablemente su excreción, situación esta última que puede ser revertida por la substancia líquénica.

- 14^a La glucosamina-6-P sintetasa ha sido purificada 113 veces, dando una sola banda en electroforesis en gel de poliacrilamida. El enzima purificado muestra una temperatura óptima de 37° y un pH óptimo de 7,5.
- 15^a La K_m del enzima para la L-glutamina ha sido estimada en 18,18 mM y en 13,3 mM para la fructosa-6-P.
- 16^a Por su movilidad electroforética, el peso molecular de la proteína ha sido estimado en aproximadamente 120.000 estando compuesta por cuatro oligómeros de pesos moleculares 38.000, 35.000, 26.000 y 24.000.
- 17^a El ácido L-úsico se comporta como un débil inhibidor del enzima para la variación de concentraciones de L-glutamina, y un indudable activador frente a variación de concentraciones de fructosa-6-P.
- 18^a El enzima muestra dos puntos de unión para el ligando, uno de alta y otro de baja afinidad.
- 19^a Dichos puntos no están relacionados con los centros involucrados en la polimerización.
- 20^a El mecanismo de unión del ligando a la proteína parece involucrar una protonación de la sustancia líquénica.
- 21^a Las mayores actividades del enzima en células de Proteus mirabilis estarán indiscutiblemente relacionadas con el engrosamiento de las paredes celulares, debiéndose tanto a un fenómeno de retención como de activación del enzima sintetizado.

9. 10

6. BIBLIOGRAFIA

AHMADJIAN, V. (1967): The Lichen Symbiosis. Blaidell Pub. Co., Waltham.

AKAMATSU, N., MAEDA, H.R. (1971): Biochim. Biophys. Acta, 244, 311.

ALBERTY, R.A., MASSEY, V., FRIEDEN, C., FUHLBRIGGE, A.R. (1954): J. Am. Chem. Soc., 76, 2485.

BARRET, J.T., KALLIO, R.E. (1953): J. Bacteriol., 66, 517.

BARTON, D.H.R., DEFLOREN, A.M., EDWARDS, D.E. (1956): J. Chem. Soc., 1956, 530.

BATES, C., PASTERNAK, C. (1965): Biochem. J., 96, 147.

BAYER, M.E. (1974): Ann. New York Acad. Sci., 215, 6.

BELL, R.M., MAVIS, R.D., OSBORN, M.J., VAGELOS, P.R. (1971): Biochim. Biophys. Acta, 249, 628.

BENNETT, P.M., HOLMS, W.H. (1975): J. gen. Microbiol., 87, 37.

BONNER, W.D. (1955): En Methods in Enzymology, Vol. I, 724. S.P. Colowick, N.O. Kaplan eds., Academic Press, New York y Londres.

BOURRILLON, R. (1969): En Traité de Biochimie Générale, III, 232. M. Javillier, M. Polonowski, M. Florin, P. Boulanger, M. Lemoigne, I. Roche y R. Wurmser eds. Masson et Cie, Paris.

BRAUM, V., REHN, K., WOLFF, H. (1970): Biochemistry, 9, 5041.

BRAUM, V., SIEGLIN, U. (1970): Eur. J. Biochem., 13, 336.

BRAUM, V., WOLFF, H. (1970): Eur. J. Biochem., 14, 387.

BRAUM, V. (1975): Biochim. Biophys. Acta, 415, 335.

BRAUM, V., ROTERING, H., OHMS, J.P., HAGENMAIER, H. (1976):
Eur. J. Biochem., 70, 601.

BROWN, D.H. (1951): Biochim. Biophys. Acta., 7, 487.

BROWN, D.H. (1976): En Lichenology: Progress and Problems.
419. D.H. Brown, L.D. Hawksworth y R.H. Bailey
eds. Academic Press, London.

BUSTINZA, F., CABALLERO, A. (1948): Anal. J. Bot., 7, 511.

BUSTINZA, F. (1951a): Endeavour, 10, 95.

BUSTINZA, F. (1951b): Farmacia Nueva, 16, 213.

BUSTINZA, F. (1951c): Rev. Bryol. Lichénol., 20, 208.
add. 20, 300.

CLANCY, C.F. (1973): En Handbook of Microbiology. VI, 230.
A.I. Laskin y H.A. Lechevalier eds. CRC Press,
Cleveland.

CLARKE, P.H., MEADOW, P.M. (1959): J. gen. Microbiol., 20,
144.

- CLARKE, J.S., PASTERNAK, C.A. (1961): Proc. Biochem. Soc.,
Biochem. J., 81, 1p.
- COLLINS, C.H. (1964): En Microbiological Methods., 127.
Butterworths, London.
- COMB, D.G., ROSEMAN, S. (1958): J. Biol. Chem., 232, 807.
- CULBERSON, C.F. (1969): Chemical and Botabical Guide to
Lichen Products. The University of North Carolina
Press, Chapel-Hill.
- DATTA, D.B., ARDEN, B., HENNING, V. (1977): J. Bacteriol.,
131, 821.
- DAVISON, E.A., BLUMENTHAL, H.J., ROSEMAN, S. (1957):
J. Biol. Chem., 226, 125.
- DE PETRIS, S. (1967): J. Ultrastruc. Res., 19, 45.
- DI RIENZO, J.M., NAKAMURA, K., INOUE, M. (1978): Ann.
Rev. Biochem., 47, 481.
- ELLIS, D.B., SOMMAR, K.M. (1971): Biochim. Biophys. Acta,
230, 531.
- ELLIS, D.B., SOMMAR, K.M. (1972): Biochim. Biophys. Acta,
267, 105.
- ENDO, A., ROTHFIELD, L. (1969): Biochemistry, 8, 3508.
- ENDO, A., KAKIKI, K., MISATO, T. (1970): J. Bacteriol., 103, 588.
- ESPIN, G., PALACIOS, R., MORA, J. (1979): J. gen. Microbiol.,
115, 59.

- ESTEVEZ, M.P., MARTINEZ, M., VICENTE, C. (1977): An.Inst. Bot. Cavanilles, 34, 309.
- FAIRBANKS, G., STECK, T.L., WALLACK, D.F.H. (1971): Biochemistry, 10, 2606.
- FASMAN, G., 1976): en Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. vol. II, pag. 144. CRC Press, Cleveland.
- FAULKNER, P., QUASTEL, J.H. (1956): Nature, 117, 1216.
- FLECK, J., MOCK, M., MINCK, R., GHUYSEN, J.M. (1971): Biochim. Biophys. Acta, 233, 489.
- FOLLMANN, G. (1960): Naturwissenschaften, 47, 405.
- FOLLMANN, G., VILLAGRAN, V. (1965): Z. Naturforsch., 20b, 723.
- FORMANEK, H., FORMANEK, S., WAWRA, H. (1974): Eur. J. Biochem., 46, 279.
- FORMANEK, H., SCHLEIFER, K.H., SEIDL, H.P., LINDEMAN, R., ZUNDEL, G. (1976): FEBS Letters, 70, 150.
- FOX, J.E., ERION, J. (1977): En Plant Growth Regulators, 139. P.E. Pilet ed., Springer Verlag, Berlin.
- FREER, J.H., SALTON, M.R.J. (1971): En Microbial Toxins. IV, 67, Weinbaum, Kadis y Ajil eds. Academic Press, New York.
- GARCIA, I. CIFUENTES, B., VICENTE, C. (1980): Z. Naturforsch., (en prensa).

- GARTEN, W., HINDENNACH, I., HENNING, U. (1975): Eur. J. Biochem., 59, 215.
- GHOS, S., BLUMENTHAL, H.J., DAVISON, E., ROSEMAN, S. (1960): J. Biol. Chem., 235, 1265.
- GHUYSEN, J.M. (1968): Bacteriol. rev., 32, 525.
- GHUYSEN, J.M., SHOCKMAN, G.D. (1973): en Microbiology, I., 37. E. Leive ed., Marcel Dekker, Inc. New York.
- GRANT, P.T., LONG, C. (1952): Biochem. J., 50, XX.
- GRUSS, P., GMAINER, J., MARTIN, H.H. (1975): Eur. J. Biochem., 57, 411.
- GRYDER, R.M., POGELL, B.M. (1960): J. Biol. Chem., 235, 558.
- HAMILTON, L., FULLER, W., REICH, E. (1963): Nature, 198, 538.
- HARPUR, R.P., QUASTEL, J.H. (1949): Nature, 164, 693.
- HASEGAWA, K., MACMILLAN, J.D., MAXGELL, W.A., CHICHESTER, C.O. (1969): Photochem. Photobiol., 9, 165.
- HEPPEL, L.A. (1967): Science, 156, 1451.
- HIGGINS, M.L. (1973): En Handbook of Microbiology, I, 686. H.A. Lechevalier, A.I. Laskin eds. CRC Press, Cleveland.
- HIRASHIMA, A., WU, H.C., VENKATESWARAN, P.S., INOUE, M. (1973): J. Biol. Chem., 248, 5654.
- IMADA, A., NOZAKI, Y., KAWASHIMA, F., YONEDA, M. (1977): J. gen. Microbiol., 100, 329.

- INOUE, M., SHAW, J., SHEN, C. (1972): J. Biol. Chem., 247, 8154.
- INOUE, M. (1974): Proc. Ntl. Acad. Sci. US. 71, 2396.
- INOUE, M. (1975): En Membrane Biogenesis. Tzagoloff ed. 351, Plenum Press, New York.
- INOUE, S., TAKEISHI, K., LEE, N., DE MARTIN, M., HIRASHIMA, A., INOUE, M. (1976): J. Bacteriol., 127, 555.
- JOHNSON, R.B., FELDOTT, G., LARDY, H.A. (1950): Arch. Biochem., 28, 313.
- KATZ, E., LORING, D., INOUE, S., INOUE, M. (1978): J. Bacteriol., 134, 674.
- KIKUCHI, H., TSUIKI, S. (1976a): Biochim. Biophys. Acta., 422, 241.
- KIKUCHI, H., TSUIKI, S. (1976b): Biochim. Biophys. Acta, 244, 231.
- KOGUT, M., PODOSKI, E.P. (1953): Biochem. J., 55, 800.
- KORNBERG, A. (1955): En Methods in Enzymology, I, 705. S.P. Colowick, N.O. Kaplan eds., Academic Press, New York & London.
- KORNFELD, S., KORNSFELD, R., NEUFELD, E.F., O'BRIEN, P.J. (1964): Proc. Ntl. Acad. Sci., US, 52, 371.
- KORNFELD, R. (1967): J. Biol. Chem., 242, 3135.

- KORTEKANGAS, A.E., VIRTANEN, O.E. (1956): Suomen Kemistilehti, 29, 2.
- KRINSKY, N.I. (1968): Photophysiol., 3, 123.
- KRINSKY, N.I. (1979): Pure and Appl. Chem., 51, 649.
- KULPA, C.F., LEIVE, L. (1976): J. Bacteriol., 126, 467.
- LAMBINON, J., MAQUINAY, A., RAMAUT, J.L. (1964): Bull. Jard. Bot. Etat, Brux., 34, 273.
- LARDY, H.A., CONNELLY, J.L., JOHNSON, D. (1964): Biochemistry, 3, 1961.
- LASKY, M. (1978): En Electrophoresis '78, 195. Catsimpolas, ed. Elsevier-North Holland. Amsterdam.
- LEE, N., CHENG, E., INOUE, M. (1977): Biochim. Biophys. Acta, 465, 650.
- LEGGET-BAILEY, I. (1967): Techniques in Protein Chemistry. Elsevier, Amsterdam.
- LEIVE, L. (1974): Ann. New York Acad. Sci., 235, 109.
- LELOIR, L.F., CARDINI, C.E. (1953): Biochim. Biophys. Acta, 12, 15.
- LELOIR, L.F., CARDINI, C.E. (1956): Biochim. Biophys. Acta, 20, 33.
- LEWIS, A.J., MILLER, J.D.A. (1975): J. gen. Microbiol., 90, 286.

- LOOMIS, W.F., LIPMANN, F. (1948): J. Biol. Chem., 193, 265.
- LOOMIS, W.D., BATTAILE, J. (1966): Phytochem., 5, 423.
- LOOMIS, W.D. (1969): En Methods in Enzymology, XIII, 555.
J.M. Lowenstein ed. Academic Press, New York
y London.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.
(1951): J. Biol. Chem., 193, 265.
- LOWTHERS, D.A., ROGERS, H.T. (1956): Biochem. J., 62, 304.
- LUDERITZ, O., GALANOS, C., LEHMANN, V., RIETSCHEL, E.T.
(1974): J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun.,
4, 381.
- LUTKEHAUS, J.F. (1977): J. Bacteriol., 131, 631.
- MANNING, P.A., PUSPURS, A., REEVES, P. (1976): J. Bacteriol.
127, 1080.
- MANSO, R., VICENTE, C. (1971): Microbiol. Españ., 24, 123.
- MAGAÑA-PLAZA, I., RUIZ-HERRERA, J. (1967): J. Bacteriol., 93,
1294.
- MARSHAK, A., FAGER, J. (1950): J. Cell. Comp. Physiol.,
35, 317.
- MATHEWS, D.A., ALDEN, R.A., BOLIN, J.T., FREER, S.T.,
HAMLIN, R., XVONG, N., KRAUT, J., POE, M.,
WILLIAMS, M., HOOGSTEEN, K. (1977): Science,
197, 452.

- MAZLEN, R.G., MUELLENBERG, C., O'BRIEN, P.J. (1969):
Biochim. Biophys. Acta, 171, 352.
- MAZLEN, R.G., MUELLENBERG, C., O'BRIEN, P.J. (1970):
Exptl. Eye Res., 9, 1.
- MCDANIEL, C.F., KIRTLEY, M.E. (1974): J. Biol. Chem.,
249, 6478.
- MELO, A., GLASER, L. (1966): Biochem. Biophys. Res. Commun.,
22, 524.
- MERETOJA, A. (1952): Farmaseuttinen Aikakauslehti, 6, 1.
- MILNER, L.S., KABACK, H.R. (1970): Proc. Natl. Acad. Sci.
US., 65, 683.
- MINDICH, L. (1973): En Bacterial Membranes and Walls. Micro-
biological Series, I, 1. L. Leive ed.
Marcel Dekker, Inc. New York.
- MIURA, T., MIZUSHIMA, S. (1968): Biochim. Biophys. Acta,
150, 159.
- MUHLRADT, P.F., MENZEL, J., GOLECKI, J.R., SPETH, V. (1973):
Eur. J. Biochem., 35, 471-481.
- MUHLRADT, P.F., MENZEL, J., GOLECKI, J.R., SPETH, V. (1974):
Eur. J. Biochem., 43, 533.
- MUHLRADT, P.F., GOLECKI, J.R. (1975): Eur. J. Biochem.,
51, 343.

MUÑOZ, M.L., RODRIGUEZ-LOPEZ, M. (1978): Plant Science Letters, 13, 275.

NAKAE, T., NIKAIDO, H. (1975): J. Biol. Chem., 250, 3759.

NAKAMURA, K., MIZUSHIMA, S. (1976): J. Biochem., 80, 1411.

NIEBOER, E., PUCKETT, K.J., GRACE, B. (1976): Can. J. Bot., 54, 724.

NIEBOER, E., RICHARDSON, D.H.S., TOMASSINI, T.D. (1978): Bryologist, 81, 266.

NIKAIDO, H. (1976): Biochim. Biophys. Acta, 433, 118.

NIKAIDO, H., SONG, S.A., SHALTIEL, L., NURMINEN, M. (1977): Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 324.

OCHOA, S. (1955): En Methods in Enzymology. I, 705.
S.P. Colowick, N.O. Kaplan eds. Academic Press,
New York & London.

OSBORN, M.J. (1969): Ann. Rev. Biochem., 38, 501.

OSBORN, M.J., GANDER, J.E., PARISI, E., CARSON, J. (1972a): J. Biol. Chem., 247, 3962.

OSBORN, M.J., GANDER, J.E., PARISI, E. (1972b): J. Biol. Chem., 247, 3973.

PALMER, H.E., HANSON, W.C., GRIFFIN, B.I. ROESCH, W.C. (1963): Science, 142, 64.

- PAYNE, J.W. (1968): J. Biol. Chem., 243, 3395.
- PAYNE, J.W., GILVARG, C. (1968): J. Biol. Chem., 243, 6291.
- PHELPS, C.F., HARDINGHAM, T.E., WINTERBURN, P.J. (1970):
Exp. Biochim. Méd., 30, 79.
- POGELL, B.M., GRyder, M. (1957): J. Biol. Chem., 228, 701.
- ROBERTS, G.C.K. (1978): En Molecular Interactions and Activity
in Proteins. Ciba Foundation Symposium 60, p. 89.
Excerpta Medica, Amsterdam.
- ROCHLEDER, F., HELET, W. (1843): Ann. Chem., 41, 1.
- ROGERS, R.J. (1974): Ann. New York Acad. Sci., 235, 29.
- ROSEMAN, S. (1956): Fed. Proc., 15, 340.
- ROSEMBUSCH, J.P. (1974): J. Biol. Chem., 249, 8019.
- RUNDEL, P.W. (1969): Bryologist, 72, 40.
- SALC, A., MIETTINEN, J.K. (1964): Nature, 201, 1177.
- SALTON, M.R.J., EHTISHAM-UD-DIM, A.F.M. (1965): Aust. J.
Exp. Med. Sci., 43, 255.
- SALTON, M.R.J., FREER, J.H. (1965): Biochim. Biophys. Acta,
107, 531.
- SAVICH, V.P., LITVINOV, M.A., MOISEEVA, E.N. (1960):
Planta Med. 8, 191.

- SCATCHARD, G., SCHEINBERG, I.H., ARMSTRONG, S.H. (1950):
J. Am. Chem. Soc., 72, 535.
- SCHLEIFER, K.H., KANDLER, O. (1972): Bact. Rev., 36, 407.
- SCHNAITMAN, C.A. (1970): J. Bacteriol., 104, 882.
- SCOTT, G.D. (1964): Advmt. Sci., 20, 244.
- SEUBERT-REMBERGER, H. (1961): Biochem. Z., 334, 401.
- SHIBATA, S., TAGUCHI, H. (1967): Tetrahedron Letters, 1967, 4867.
- SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. (1972): Biochim. Biophys. Acta,
175, 720.
- SISTROM, W.R., GRIFFITH, M., STANIER, R.Y. (1956): J. Cell.
Comp. Physiol., 48, 473.
- SOLS, A., DE LA FUENTE, G. (1957): Rev. esp. Fisiol., 13,
231.
- SOLS, A., SILLERO, A., SALAS, J. (1965): J. Cell. Comp.
Physiol., 68, 23.
- SOODAK, M. (1955): Bacteriol. Proc., 131.
- STANDARD METHODS (1955): pag. 390. American Public Health
Association Inc., New York.
- STEVEN, A.C., TEN HEGGELER, B., MÜLLER, R., KISTLER, J.,
ROSENBUSCH, J.P. (1977): J. Cell. Biol., 72, 292.
- STOLL, A., BRACK, A., RENG, J. (1947): Experientia, 3, 115.

- STRANGE, R.E., DARK, F.A. (1960): Nature, 138, 741.
- SYERS, J.K., ISKANDAR, I.K. (1973): En The Lichens, 225.
V. Ahmadjian, M.E. Hale eds. Academic Press,
New York.
- TAKAHASHI, Y. (1975): J. Biochem., 78, 1097.
- TOMASELLI, R. (1957): Chem. Abst., 51, 9091c.
- TSUCHIYA, T. (1976): J. Biol. Chem., 251, 5315.
- UTTER, M.F., DUELL, E.A., EERNOFSKY, C. (1968): En Aspects
of yeast Metabolism, 197. M.E. Mills ed. Blackwell,
Oxford.
- VAN ALPHEN, L., HAVEKES, L., LUGTENBERG, B. (1977a): FEBS
Letters, 75, 285.
- VAN ALPHEN, L., LUGTENBERG, B., VAN BOXTEL, P., VERHOEF,
K. (1977b): Biochim. Biophys. Acta, 466, 257.
- VARTIA, K.O. (1950): On Antibiotic Effects of Lichens and
Lichen Substances. Helsinki University. Helsinki.
- VICENTE, C., GUERRA, H., VALLE, M.T. (1974): Rev. Esp.
Fisiol., 30, 1.
- VICENTE, C. (1975): Fisiología de las substancias liquénicas.
Alhambra, Madrid.

- VICENTE, C., ESTEVEZ, M.P., GARCIA, F. (1975): An. Inst. Bot. Cavanilles, 32, 577.
- VICENTE, C., ESTEVEZ, M.P. (1976): Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol.), 74, 17
- VICENTE, C., AZPIROZ, A., ESTEVEZ, M.P., GONZALEZ, M.L. (1978): Plant, Cell and Environment, 1, 29.
- VICENTE, C., CIFUENTES, B. (1979): Plant Science Letters, 15, 165.
- VIRTANEN, O.E. (1954): Suomen Kemistilehti, 27, 67.
- VIRTANEN, O.E., VAHATALO, M.L., KORTEKANGAS, A.E. (1956): Suomen Kemistilehti, 29, 30
- VIRTANEN, O.E., KILPIO, O.E. (1957): Suomen Kemistilehti, 30, 8.
- VORBECK, M.L., MARINETTI, G.V. (1965): Biochemistry, 4, 296.
- WEBER, K., OSBORN, M. (1969): J. Biol. Chem., 25, 4406.
- WINTERBURN, P.J., PHELPS, C.F. (1971a): Biochem. J., 121, 701.
- WINTERBURN, P.J., PHELPS, C.F. (1971b): Biochem. J., 121, 711.
- WINTERBURN, P.J., PHELPS, C.F. (1971c): Biochem. J., 121, 721.
- WHITE, D.A., ALBRIGHT, F.R., LENNARZ, W.J., SCHNAITMAN, C.A. (1971): Biochim. Biophys. Acta, 249, 636.

YU, F., MIZUSHIMA, S. (1977): Biochem. Biophys. Res. Commun.,
74, 1397.

ZINSOU, C., COSTES, C. (1973): Physiol. Vég., 11, 191.

